

**Charakterisierung des ATP-gekoppelten Elektronentransfers zwischen dem Corrino-
Iron-Sulfur-Protein von *Carboxydotherrnus hydrogenoforrmans* und seinem Aktivator**

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

eingereicht an der

Lebenswissenschaftlichen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin

von

M.Sc., Felix, Neumann

Präsidentin

der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät
der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Dr. Christian Ulrichs

Gutachter/innen

1. Prof. Dr. Holger Dobbek
2. Prof. Dr. Peter Hildebrandt
3. Prof. Dr. Thomas Eitinger

Tag der mündlichen Prüfung: 25.05.21

Inhalt

I.	Zusammenfassung.....	IV
II.	Summary.....	VI
1	Einleitung	1
1.1	Elektronenbifurkation.....	2
1.2	Nitrogenase.....	3
1.3	Acetate and Sugar Kinases / Heat Shock Protein 70/Actin (ASKHA)-ATPasen	5
1.3.1	ATP-abhängige Benzoyl-CoA-Reduktasen.....	6
1.3.2	Aktivator der (R)-2-Hydroxyacyl-CoA-Dehydratasen	8
1.3.3	Reductive Activators of Corrinoid-dependent Enzymes (RACE)-Proteine	9
1.3.3.1	Der Reductive Activator of CoFeSP (RACo)	11
1.4	Zielsetzung dieser Arbeit.....	16
2	Material und Methoden.....	17
2.1	Chemikalien	17
2.2	Nährmedien.....	17
2.3	Bakterienstämme und Antibiotika	17
2.4	Anoxisches Arbeiten.....	18
2.5	Molekularbiologische Methoden	18
2.5.1	DNA-Hydrolyse mittels Restriktionsendonukleasen	18
2.5.2	Ligation	18
2.5.3	Agarosegelelektrophorese.....	18
2.5.4	Plasmidpräparation	19
2.5.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	19
2.5.6	Dephosphorylierung von linearisierten Vektoren	19
2.5.7	Reinigung von PCR-Produkten und Elution von DNA aus Agarosegelen	20
2.5.8	Klonierung.....	20
2.6	Mikrobiologische Methoden.....	21
2.6.1	Transformation	21
2.6.1.1	Transformation chemisch-kompetenter Zellen	21
2.6.1.2	Transformation elektrisch-kompetenter Zellen	21
2.6.2	Rekombinante Genexpression in <i>Escherichia coli</i>	21
2.7	Proteinreinigung	22
2.7.1	Zellaufschluss	22

2.7.2	Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC)	23
2.7.3	Anionenaustauschchromatographie	23
2.7.4	Größenausschlusschromatographie	24
2.8	Proteinbiochemische und biophysikalische Methoden	25
2.8.1	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese	25
2.8.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	25
2.8.2.1	Berechnung über Lambert-Beer	25
2.8.2.2	Konzentrationsbestimmung nach Bradford	26
2.8.3	Bestimmung des Cofaktorgehaltes	26
2.8.3.1	Eisengehalt	26
2.8.3.2	Cobalamingehalt	26
2.8.4	Bestimmung der Orthophosphatkonzentration mittels Malachitgrün	27
2.8.5	Michael-Addition von Cysteinen mit N-[2-(1-maleimidyl)ethyl]-7-(diethylamino)coumarin-3-carboxamid	27
2.8.6	UV/Vis Spektroskopie	27
2.9	<i>Stopped-flow</i> -Spektroskopie	27
2.9.1	Charakterisierung des Elektronentransfers zwischen RACo und CoFeSP	28
2.9.2	Elektronenübergang in Abhängigkeit von der Ammoniumchloridkonzentration	29
2.9.3	Elektronenübergang in Abhängigkeit von der Kaliumchloridkonzentration	30
2.9.4	Bestimmung von K_D und k_{lim} in Abhängigkeit der ATP-Konzentration	30
2.9.5	Charakterisierung der Interaktionen von RACo ^{ox} und Co(II)FeSP mittels Tryptophanfluoreszenz	30
2.9.6	Charakterisierung der Phosphatdissoziation von Co(II)FeSP:RACo ^{red}	31
2.9.6.1	Anionenaustauschchromatographie zur ATP-Reinigung	32
2.10	Titration des ADP induzierten Elektronentransfers zwischen RACo und CoFeSP	32
2.11	Präparation von Co(I)FeSP und Interaktionsanalyse von Co(I)FeSP und RACo ^{ox}	33
2.12	Charakterisierung der ATP-Hydrolyse während des Elektronentransfers von Co(II)FeSP:RACo ^{red}	33
2.12.1	ADP-Quantifizierung mittels HPLC	34
3	Ergebnisse	35
3.1	Rekombinante Genexpression und Proteinreinigung	35
3.1.1	RACo	35
3.1.2	CoFeSP	36

3.1.3	MDCC-PBP	37
3.2	Optimierung der Reaktionsbedingungen der Elektronentransferreaktion von reduziertem RACo auf Co(II)FeSP	39
3.3	Auswirkung verschiedener Kationen auf den ATP-gekoppelten Elektronentransfer	41
3.4	Untersuchung des ratenlimitierenden Schrittes und der Reversibilität des Elektronentransfers	48
3.5	Komplex- und Phosphat-Dissoziation nach Elektronentransfer	52
4	Diskussion.....	55
4.1	Rekombinante Genexpression und Proteinreinigung	55
4.2	Optimierung der Reaktionsbedingungen der Elektronentransferreaktion von reduziertem RACo auf Co(II)FeSP	56
4.3	Auswirkung verschiedener Kationen auf den ATP-gekoppelten Elektronentransfer	57
4.4	Eine Konformationsänderung nach der Nukleotid-Bindung ist der ratenlimitierende Schritt des Elektronentransfers	61
4.5	Ausbildung eines bidirektionalen Elektronentransfers zwischen RACo und CoFeSP.	63
4.6	Komplex- und Phosphatdissoziation.....	64
4.7	Mögliche Reaktionsmechanismen des ATP-gekoppelten <i>uphill</i> Elektronentransfers zwischen RACo und CoFeSP	66
5	Ausblick.....	72
6	Literatur	74
7	Anhang.....	85
8	Abkürzungsverzeichnis.....	89
9	Danksagung	91
10	Selbständigkeitserklärung	92

I. Zusammenfassung

Elektronentransferreaktionen von und zwischen Proteinen sind ein Bestandteil der Atmungskette, Photosynthese oder Stickstofffixierung und damit Fundamentalreaktionen des Lebens, wie wir es kennen. Dabei sind die meisten dieser Elektronentransfers exergonisch, in welchem die Reduktionskraft abnimmt und dementsprechend das Redox-Potential zunimmt. Es gibt jedoch auch Proteine, die in der Lage sind ein Elektron *uphill* zu transferieren. Ein *uphill* Elektronentransfer ist endergonisch, wobei das Elektron auf ein Reaktionspartner mit niedrigerem Redox-Potential transferiert wird. Um die Energiebarriere dieser thermodynamisch ungünstigen Reaktion zu überwinden, muss sie mit einer thermodynamisch günstigeren Reaktion gekoppelt werden. Eine Möglichkeit ist die Kopplung an die Hydrolyse von ATP. Diese Strategie wird zum Beispiel bei der Stickstofffixierung oder der Aktivierung von Proteinen genutzt. So kann das **Corrinoid Iron (Fe) Sulfur Protein** (CoFeSP) des Organismus *Carboxydotherrmus hydrogenoformans* durch den **Reductive Activator of CoFeSP** (RACo) und einem ATP-gekoppelten *uphill* Elektronentransfer aktiviert oder reaktiviert werden. Dabei wird das Kobalt-Ion des Cobalamins von CoFeSP reduziert und das Protein wird von seinem inaktiven Zustand Kobalt(II)-CoFeSP in seinen aktiven Zustand Kobalt(I)-CoFeSP überführt. In der vorliegenden Arbeit wurde der ATP-gekoppelte *uphill* Elektronentransfer von reduziertem RACo (RACo^{red}) auf Kobalt(II)-CoFeSP untersucht. Dazu wurden zunächst die Bedingungen der rekombinanten Genexpression in *Escherichia coli* und die Reinigungsstrategie der Proteine verbessert, um einen Cofaktorgehalt beider Proteine von annähernd 100 % zu erreichen. Anschließend wurden die Reaktionsbedingungen des Elektronentransfers optimiert, um eine tiefergehende Analyse zu ermöglichen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass durch die Bindung von ATP ein bidirektionaler Elektronentransfer induziert wird. Der Elektronentransfer konnte mit nicht-hydrolysierbaren ATP-Analoga und mit ADP induziert werden. Weder für die nicht-hydrolysierbaren ATP-Analoga noch für ADP konnten anschließend Hydrolyseprodukte nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte für die limitierende Rate der ATP-Hydrolyse ein mehr als 100-fach kleinerer Wert bestimmt werden als für den Elektronentransfer. Beide Ergebnisse zeigen, dass der Elektronentransfer unabhängig von der ATP-Hydrolyse ist. Kobalt(I)-CoFeSP kann jedoch auch ein Elektron auf oxidiertes RACo (RACo^{ox}) übertragen, was auf einen bidirektionalen Elektronentransfer hindeutet. Diese These wurde mit der Beobachtung untermauert, dass sich durch Zugabe von ADP und der Erhöhung der ADP-Konzentration die Anzahl der transferierten Elektronen pro CoFeSP zunimmt und sich somit die Lage des entstehenden Gleichgewichts verschieben lässt.

Die gemessenen Werte deuten darauf hin, dass nach der ATP-Bindung ein Gleichgewicht entsteht, in welchem Kobalt(II)-CoFeSP und Kobalt(I)-CoFeSP in vergleichbaren Konzen-

trationen vorliegen. Die Lage dieses Gleichgewichtes kann durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden. So kann der Elektronentransfer von Kobalt(I)-CoFeSP auf RACo^{ox} durch die Reduktion von RACo verhindert werden. Des Weiteren können verschiedene Ionen die Bindung von ATP und damit auch die Lage des Gleichgewichtes beeinflussen. Ein ATP-gekoppelter *uphill* Elektronentransfer konnte nur in Anwesenheit von Mg^{2+} , K^+ oder NH_4^+ gemessen werden. K^+ und NH_4^+ besitzen eine zweite Bindungsstelle und unterstützen zusätzlich eine für den Elektronentransfer günstige Konformation. In dieser Konformation wird die Geschwindigkeitskonstante der Hin- und Rückreaktion des Elektronen-transfers erhöht, sodass sich die Lage des Gleichgewichtes nicht ändert. Ein spezifischer Einfluss der Ionen auf die Proteininteraktionen konnte nicht gemessen werden.

Die Reduktion von Kobalt(II)-CoFeSP zu Kobalt(I)-CoFeSP verringert hingegen die Interaktionen der Proteine. Zusätzlich konnte eine Erhöhung der Geschwindigkeitskonstante der Komplexdissoziation in Anwesenheit von ADP und eine ähnliche limitierende Geschwindigkeitskonstante für die ATP-Hydrolyse und die Dissoziation des γ -Phosphates ermittelt werden. Auf dieser Datengrundlage konnten drei mögliche Modelle für den Reaktionsmechanismus erstellt werden, von welchen ein Modell als am wahrscheinlichsten erscheint.

In diesem Reaktionsmechanismus gleichen sich die Redox-Potentiale beider Redox-Zentren durch die ATP-Bindung an. Dies ermöglicht den Elektronentransfer vom $[\text{2Fe2S}]$ -Cluster von RACo auf das Kobalt-Ion des Cobalamins. Die Rückreaktion wird durch eine erneute Reduktion des $[\text{2Fe2S}]$ -Clusters verhindert und durch die anschließende ATP-Hydrolyse dissoziiert der Komplex.

Dieser Mechanismus unterscheidet sich grundlegend von allen bisher bekannten Mechanismen für den ATP-gekoppelten *uphill* Elektronentransfer. Die Inhibition der Rückreaktion durch eine zweite Reduktion ist eine neue Antwort auf die Frage, wie Enzyme unidirektionale *uphill* Elektronentransfers ermöglichen.

II. Summary

Electron transfer reactions from and between proteins are a part of the respiratory chain, photosynthesis or nitrogen fixation and thus fundamental reactions of life as we know it. Most of these electron transfers are exergonic, in which the reducing power decreases and the redox potential increases accordingly. However, there are proteins that are able to transfer an electron uphill. An uphill electron transfer is endergonic, in which the electron is transferred to a reaction partner with a lower redox potential. To overcome the energy barrier of this thermodynamically unfavorable reaction, it must be coupled to a thermodynamically more favorable reaction. One possibility is to couple it to the hydrolysis of ATP. This strategy is used, for example, in nitrogen fixation or protein activation. For example, the **Corrinoid iron (Fe) Sulfur Protein** (CoFeSP) of the organism *Carboxydotherrmus hydrogenoformans* can be activated or reactivated by the **Reductive Activator of CoFeSP (RACo)** and an ATP-coupled uphill electron transfer. In this process, the cobalt ion of cobalamin is reduced by CoFeSP and the protein is transferred from its inactive state cobalt(II)-CoFeSP to its active state cobalt(I)-CoFeSP.

In the present work, ATP-coupled uphill electron transfer from reduced RACo (RACo^{red}) to cobalt(II)-CoFeSP was investigated. For this purpose, the conditions of recombinant gene expression in *Escherichia coli* and the purification strategy of the proteins were improved to achieve a cofactor content of both proteins close to 100%. Subsequently, the electron transfer reaction conditions were optimized to enable a more in-depth analysis.

The results of this work indicate that a bidirectional electron transfer is induced by the binding of ATP. Electron transfer could be induced with non-hydrolysable ATP analogues and with ADP. Neither for the nonhydrolyzable ATP analogues nor for ADP hydrolysis products could subsequently be detected. In addition, a value more than 100-fold smaller could be determined for the limiting rate of ATP hydrolysis than for electron transfer. Both results indicate that electron transfer is independent of ATP hydrolysis. However, cobalt(I)-CoFeSP can also transfer an electron to oxidized RACo (RACo^{ox}), suggesting bidirectional electron transfer. This hypothesis was supported with the observation that adding ADP and increasing the ADP concentration increases the number of transferred electrons per CoFeSP by shifting the position of the emerging equilibrium.

The measured values indicate that after ATP binding, an equilibrium is formed in which cobalt(II)-CoFeSP and cobalt(I)-CoFeSP are present in comparable concentrations. The location of this equilibrium can be influenced by several factors. For example, electron transfer from cobalt(I)-CoFeSP to RACo^{ox} can be prevented by the reduction of RACo. Furthermore, various ions can affect the binding of ATP and thus the position of the equilibrium. ATP-coupled uphill electron transfer could only be measured in the presence of Mg²⁺, K⁺, or NH₄⁺. K⁺ and

NH_4^+ have a second binding site and additionally support a conformation favorable for electron transfer. In this conformation, the rate constant of the forward and reverse reaction of electron transfer is increased, so that the position of the equilibrium does not change. No specific influence of the ions on the protein interactions could be measured.

In contrast, the reduction of cobalt(II)-CoFeSP to cobalt(I)-CoFeSP decreases the protein interactions. In addition, an increase in the rate constant of complex dissociation in the presence of ADP and a similar rate limiting constant for ATP hydrolysis and dissociation of γ -phosphate could be determined. Based on these data, three possible models for the reaction mechanism are suggested, of which one model appears to be the most plausible.

In this reaction mechanism, the redox potentials of both redox centers equalize due to ATP binding. This allows electron transfer from the $[\text{2Fe}_2\text{S}]$ cluster of RACo to the cobalt ion of cobalamin. The back reaction is prevented by a further reduction of the $[\text{2Fe}_2\text{S}]$ cluster, and subsequent ATP hydrolysis dissociates the complex.

This mechanism is fundamentally different from any previously reported mechanisms of the ATP coupled uphill electron transfer. Inhibition of the back reaction by a second reduction is a new answer to the question how enzymes enable unidirectional uphill electron transfers.

1 Einleitung

Im September 2019 wurde ein Positionspapier der Gesellschaft für chemische Technik und Biotechnologie e.V. verfasst, welches sich mit der Kombination von mikrobiellen Synthesen oder enzymatischen Reaktionen mit elektrochemischen Verfahrensschritten befasst. Die Verfasser Dirk Holtmann und Falk Harnisch sehen Deutschland mit führend im Bereich der Elektrobiotechnologie¹. Hierfür wurden verschiedene Förderungsmaßnahmen ins Leben gerufen, in welchen der Gedanke der Rohstoffsicherung, Nachhaltigkeit und des Klimaschutzes im Mittelpunkt steht. Anwendungsmöglichkeiten sind z. B. die Abwasserbehandlung, Biophotovoltaik, Enzymatische Elektrosynthese und Enzymatische Biosensoren² (Abb. 1-1). Grundlage für die Entwicklung solcher Technologien ist meist ein tiefgehendes Verständnis des Elektronentransports und der zugrundeliegenden Mechanismen.

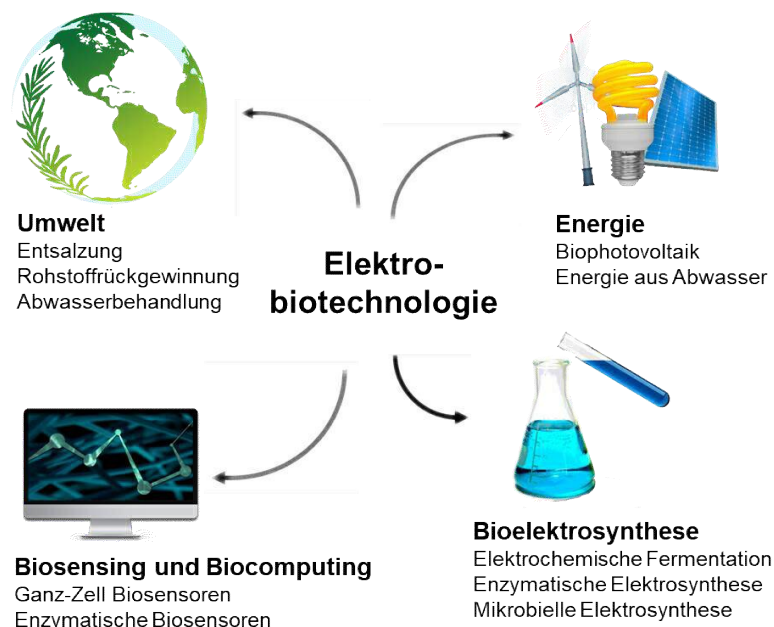


Abbildung 1-1. Anwendungsgebiete der Elektrobiotechnologie. Die Abbildung wurde erstellt nach Holtmann und Harnisch¹.

Elektrochemische Prozesse wie z. B. der Elektronentransfer zwischen Proteinen sind aber nicht nur für die industrielle Forschung interessant, viel mehr bilden sie die Grundlage für das Leben auf der Erde. In Mitochondrien, welche auch als Kraftwerke der Zelle bezeichnet werden, erfolgt ein Elektronentransfer von NADH oder FADH₂ auf Sauerstoff über fünf Multiproteinkomplexe. Dabei nimmt das Redox-Potential schrittweise zu und die freiwerdende Energie wird genutzt, um einen Protonengradienten aufzubauen. Durch den Rückfluss der Protonen wird Energie in Form von ATP gespeichert³. Auch in der Lichtreaktion der Photosynthese wird eine Elektronentransportkette für die Synthese von ATP und NADPH genutzt. Die Elektronen werden hier durch Photonen angeregt. Die weiterführende

Erforschung der Proteine und ihrer Elektronentransportmechanismen sind die Grundlage für neuartige Biophotovoltaikanlagen⁴.

Andere Proteine und Proteinkomplexe wie z. B. die Nitrogenase, Benzoyl-CoA-Reduktasen, die Aktivatoren von 2-Hydroxyacyl-CoA-Dehydratasen oder **Reductive Activators of Corrinoid-dependent Enzymes**- (RACE)-Proteine sind in der Lage unter ATP-Hydrolyse Elektronen *uphill* zu übertragen. Ein *uphill* Elektronentransfer ist definiert als ein endergonischer Elektronentransfer, bei welchem der Elektronenakzeptor ein niedrigeres Redox-Potential besitzt⁵. Diese Eigenschaft erschließt weitere Anwendungsgebiete. So konnte gezeigt werden, dass der Vanadium-Nitrogenase-Komplex Kohlenstoffdioxid zu Kohlenstoffmonoxid⁶ und diesen weiter zu Ethylen, Ethan und Propan reduzieren kann⁷. Diese Eigenschaften könnten genutzt werden, um mit Hilfe der Nitrogenase Brennstoffe zu generieren⁸. Benzoyl-CoA-Reduktasen können toxische und karzinogene Benzolverbindungen wie Phenol, Naphthalin oder Phthalsäureester reduzieren^{9–11}, was einen initialen Schritt für den Abbau der Verbindungen darstellt. Der *uphill* Elektronentransfer ermöglicht aber nicht nur chemische Reaktionen von inerten Substraten wie CO₂, N₂ oder Benzol-Verbindungen, er ist zudem oft fester Bestandteil verschiedener Stoffwechselwege und Aktivierungsreaktionen von Enzymen. So werden 2-Hydroxyacyl-CoA-Dehydratasen und Corrinoid-abhängige Enzyme durch einen ATP-gekoppelten *uphill* Elektronentransfer aktiviert. Weiterführende Untersuchungen könnten neue Anwendungsgebiete schaffen.

1.1 Elektronenbifurkation

Elektronenbifurkation ist die Aufspaltung eines Elektronenpaar, bei welcher ein Elektron auf einen Akzeptor mit höherem Redox-Potential transferiert wird, während das andere Elektron auf einen Akzeptor mit niedrigerem Redox-Potential transferiert wird. Es erfolgt also eine Kopplung eines exergonischen mit einem endergonischen Elektronentransfer. Soweit sind für den *uphill* Elektronentransfer nur Ferredoxin und Flavodoxin als Elektronenakzeptoren bekannt.

Elektronenbifurkation erlaubt Organismen z. B. die Fixierung von N₂¹², die Reduktion von CO₂¹³ und die Produktion von H₂¹⁴. Aber auch innerhalb der Atmungskette und der Photosynthese wird die Elektronenbifurkation genutzt¹⁵. Im Cytochrom-*bc₁*-Komplex der Atmungskette entsteht aus einem Ubihydrochinon durch die Reduktion des Rieske-Zentrums eines Ferredoxins (*uphill*) ein Ubisemichinon. Vom Ferredoxin wird dann das Elektron über ein Cytochrom *c₁* auf Cytochrom *c* übertragen. Das entstandene Ubisemichinon überträgt nun das verbleibende Elektron exergonisch über Häm *b_L* auf Häm *b_H* auf ein weiteres Ubichinon¹⁶.

Um den *uphill* Elektronentransfer zu ermöglichen, muss der Transport der Elektronen gesteuert werden. Das heißt, es muss verhindert werden, dass beide Elektronen den thermodynamisch günstigeren exergonischen Elektronentransfer durchlaufen. Im Cytochrom-

bc₁-Komplex geschieht dies durch Konformationsänderungen (*conformational gating*). Für den Elektronentransfer auf das Ferredoxin wird das Ubihydrochinon zunächst in dessen räumliche Nähe gebracht. Nach erfolgtem Elektronentransfer wird der Abstand beider Zentren erhöht, um den Transfer auf das Cytochrom *c₁* zu unterstützen^{17,18}. Es wird jedoch angenommen, dass der Elektronentransfer reversibel ist und eine Folge verschiedener Konformationsänderungen für einen effektiven Elektronentransfer nötig ist^{18,19}.

1.2 Nitrogenase

Der Enzymkomplex Nitrogenase kommt in verschiedenen Bakterien und Archaeen vor. Er ist in der Lage unter Standardbedingungen molekularen Stickstoff und Protonen zu Ammoniak zu reduzieren. Als Nebenprodukt wird molekularer Wasserstoff frei²⁰. Da N₂ eine inerte Verbindung mit einer Bindungsenergie von 945 kJ/mol ist, wird dementsprechend viel Energie für die Spaltung der Dreifachbindung benötigt. Im industriellen Haber-Bosch-Verfahren für die Herstellung von Ammoniak wird das durch Drücke von 150 – 350 bar, Temperaturen von 400 – 500 °C und eisenhaltigen Katalysatoren erreicht. Die Nitrogenase nutzt hingegen 16 ATP-Moleküle für die Synthese von zwei Ammoniakmolekülen^{21,22}. Das heißt, es werden pro übertragenem Elektron zwei ATP-Moleküle hydrolysiert. In Analogie zu den eisenhaltigen Katalysatoren des Haber-Bosch-Verfahrens besteht die Nitrogenase aus eisenhaltigen Proteinen. Sie setzt sich aus dem homodimeren Fe-Protein und dem heterotetrameren MoFe-Protein zusammen. Die beiden Untereinheiten des Fe-Proteins sind über ein [4Fe4S]-Cluster in einem Helix-Cluster-Helix-Motiv miteinander verbunden²³. Das MoFe-Protein besitzt ein [8Fe7S]-Cluster (P-Cluster) und einen FeMo-Cofaktor²⁴. Entsprechend des Cofaktors gibt es aber auch VFe- und FeFe-Nitrogenasen.

Bei dem ATP-gekoppelten Elektronentransfer wird ein Elektron vom [4Fe4S]-Cluster des Fe-Proteins über das P-Cluster auf den FeMo-Cofaktor (analog VFe- oder FeFe-Cofaktor) übertragen. Dieser reduziert dann H⁺ und N₂ zu H₂ und NH₃. Der Katalyse-Zyklus beginnt mit der Bindung von zwei ATP durch das Fe-Protein. Anschließend interagieren beide Proteine miteinander und es kommt zum Elektronentransfer vom Fe-Protein auf das MoFe-Protein (Abb. 1-2). Erst nach der Hydrolyse von ATP und der Freisetzung des entstehenden Orthophosphates (P_i) dissoziieren die Proteine voneinander. Das Fe-Protein wird reduziert und kann nach ADP-Dissoziation den Zyklus erneut beginnen²⁵. Dieser muss 8-mal durchlaufen werden, um zwei NH₃ aus N₂ zu bilden.

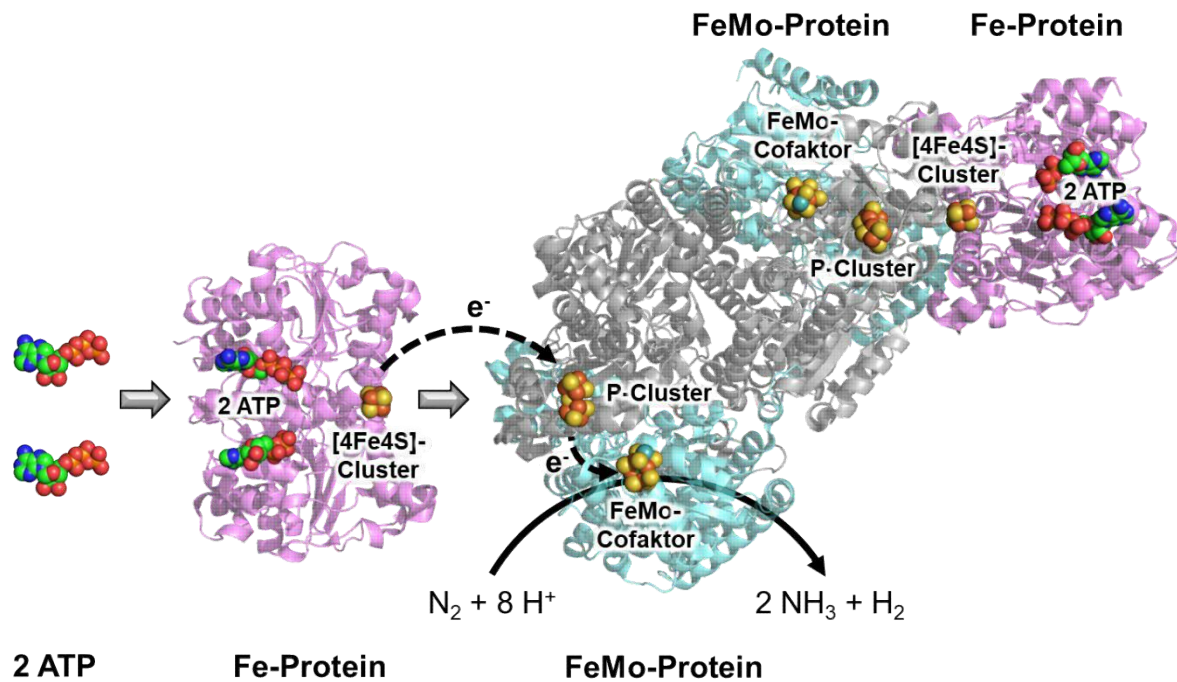


Abbildung 1-2. Mo-Nitrogenase-Komplex aus *Azotobacter vinelandii*. Das Fe-Protein ist in pink und das MoFe-Protein ist in cyan und grau dargestellt (PDB-Nummer: 4WZA²⁶). Die Atome der ATP-Moleküle und Cofaktoren sind als Kugeln dargestellt. Die grauen Pfeile deuten Ablauf der Reaktion an, in welchem erst zwei ATP-Moleküle gebunden werden und anschließend das Fe-Protein und FeMo-Protein miteinander interagieren. Die gestrichelten Pfeile geben den Elektronenfluss beispielhaft an einem aktiven Zentrum wieder (Abbildung erstellt mit PyMOLTM nach Gu et al.²⁷).

Der Elektronentransfer wird, ähnlich der Elektronenbifurkation, durch eine Folge von Konformationsänderungen gesteuert²⁸. Die Bindung von ATP verstärkt die Wechselwirkungen zwischen dem [4Fe4S]-Cluster des Fe-Proteins und dem P-Cluster durch eine räumliche Annäherung²⁹. Dabei ändert sich der Winkel des Helix-Cluster-Helix-Motivs von 150° auf 180°, was den Abstand beider Zentren um 4 Å verringert³⁰.

In der Folge verringert sich das Redox-Potential des [4Fe4S]-Clusters um 320 mV^{31,32} und das Redox-Potential des P-Clusters um 80 mV³². Es wird davon ausgegangen, dass durch weitere Konformationsänderungen das P-Cluster in einen reaktiven Zustand gebracht wird, in welchem zuerst ein Elektron auf den FeMo-Cofaktor übertragen wird. Erst danach überträgt das Fe-Protein in einer „Auffüll-Reaktion“ (*deficit spending model*) ein Elektron auf das P-Cluster³³. Da nur für den Elektronentransfer vom P-Cluster auf den FeMo-Cofaktor Konformationsänderungen ratenlimitierend sind, wird angenommen, dass das entstehende Elektronen-Defizit des P-Clusters der Grund für den unidirektionalen Elektronentransfer ist³⁴. Nach dem Elektronentransfer entsteht ein „angespannter“ (*taut*) Proteinkomplex, welcher durch ATP-Hydrolyse und P_i-Freisetzung dissoziiert²².

Mit dem **Double-Cubane Cluster Protein** (DCCP) und der DCCP-Reduktase konnte ein Proteinkomplex mit ähnlichen Eigenschaften beschrieben werden. Dieser Proteinkomplex kann unter ATP-Hydrolyse N_2H_2 und N_3^- zu Ammoniak reduzieren. Dabei findet die Reduktion an einem zum P-Cluster ähnlichen $[8Fe_9S]$ -Cluster von DCCP statt, welches durch einen ATP-gekoppelten *uphill* Elektronentransfer der DCCP-Reduktase reduziert wird³⁵. Interessanterweise ist DCCP homolog zu den ATP-abhängigen Benzoyl-CoA-Reduktasen und den (R)-2-Hydroxyacyl-CoA-Dehydratasen³⁶. Auf beide Proteine wird in den folgenden Abschnitten noch eingegangen. Da alle im Folgenden behandelten Proteine jedoch auch zur Familie der **Acetate and Sugar Kinases / Heat Shock Protein 70/Actin** (ASKHA)-ATPasen gehören, wird diese Proteinfamilie im kommenden Abschnitt kurz beschrieben.

1.3 Acetate and Sugar Kinases / Heat Shock Protein 70/Actin (ASKHA)-ATPasen

Das Strukturmotiv der ASKHA-ATPasen ist die $\beta\beta\alpha\beta\alpha\beta$ -Topologie. In dieser Folge von β -Faltblättern und α -Helices variiert sowohl die Tertiärstruktur als auch die Sequenz der Aminosäuren. Drei Merkmale sind jedoch in dieser Topologie konserviert. Zwischen dem ersten und zweiten β -Strang befindet sich eine konservierte Asparaginsäure³⁷. Diese koordiniert ein Magnesium-Ion, welches wiederum das β - und γ -Phosphat des ATP koordiniert^{38–40}. Am Anfang der dritten α -Helix befindet sich eine Asparagin- oder Glutaminsäure, welche als Base für die Hydrolyse wirkt³⁷. Das Bindungsmotiv für das Adenosin befindet sich in einer Loop-Struktur nach dem vierten β -Strang. Abbildung 1-3 zeigt, dass die $\beta\beta\alpha\beta\alpha\beta$ -Topologie in den vier namensgebenden Proteinen zwei Mal vorhanden ist. Die beschriebenen konservierten Eigenschaften sind demzufolge nur in einem Strukturmotiv zu finden.

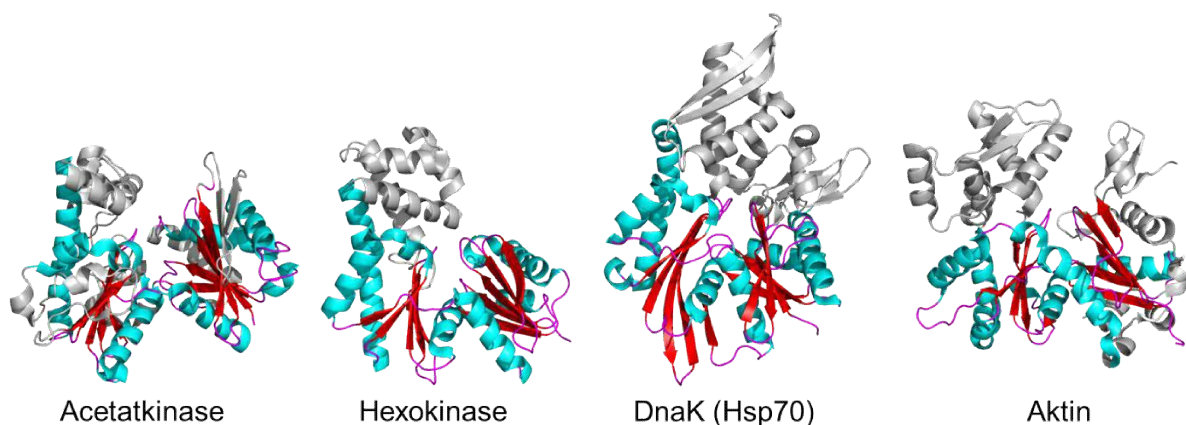


Abbildung 1-3. Vergleich der Proteinstruktur ausgewählter ASKHA-ATPasen. Von der $\beta\beta\alpha\beta\alpha\beta$ -Topologie sind β -Faltblätter in rot, α -Helices in cyan und *Loop*-Strukturen in lila dargestellt. Nicht zur charakteristischen ASKHA-Topologie gehörende Strukturen sind in grau gezeigt. Die für die jeweiligen Strukturen hinterlegten PDB-Nummern sind Acetatkinase: 1TUU⁴¹; Hexokinase: 2E2Q⁴²; DnaK: 4JNE⁴³; Aktin: 2HF4⁴⁴. Die Abbildung wurde erstellt mit PyMOL™ nach Yang et al.³⁷.

Auch die Funktion von ATP variiert sehr stark zwischen unterschiedlichen Vertretern der ASKHA-ATPasen. Die Acetatkinase und Hexokinase phosphorylieren ihre jeweiligen Substrate, während Mitglieder der *Heat Shock Protein 70* und Aktin durch ATP-Bindung, Hydrolyse und der Dissoziation des γ -Phosphats Affinitäten zu Interaktionspartnern ändern. Die Acetatkinase katalysiert die Phosphorylierung von Acetat, welches in manchen Mikroorganismen für die Bildung von Acetyl-CoA genutzt wird. Acetyl-CoA ist auf Grund des hohen Gruppenübertragungspotenzials des Thioesters ein wichtiges Intermediat von vielen katabolen und anabolen Stoffwechselwegen. Die Acetatkinase kann jedoch auch die Synthese von ATP aus Acetyl-Phosphat und ADP katalysieren⁴⁵. Hexokinasen sind ebenfalls Phosphotransferasen und übertragen das γ -Phosphat des ATP auf Hexosen. Die bekannteste Reaktion ist die Phosphorylierung von Glukose zu Glukose-6-Phosphat, was die erste Reaktion der Glykolyse darstellt.

Die Enzyme der *Heat Shock Protein 70* (Hsp70)-Familie sind ATP-abhängige Chaperone. Eines der am besten charakterisierten ist das *E. coli*-Protein DnaK. Während der Proteinsynthese binden Hsp70-Proteine an Aminosäureketten, um die Aggregation des Proteins, bevor das Protein die korrekte Faltung annimmt, zu verhindern. Dabei binden die Chaperone zunächst ATP und anschließend an das Zielprotein. Die Interaktion mit dem Zielprotein erhöht die Hydrolyserate^{46,47}. Nach der Hydrolyse bindet Hsp70 stärker an das Zielprotein⁴⁸ und dissoziiert nach dem Austausch von ADP durch ATP.

Aktin kommt in eukaryotischen Zellen und auch in Form von Homologen in anderen Organismen vor⁴⁹⁻⁵¹. Es bildet Mikrofilamente aus und dient zur Zellstabilität, Zellbewegung und Muskelkontraktion. Aktin bindet als Einzelmolekül (G-Aktin) ATP und geht dadurch in die aktive Form über. Einzelne Proteine interagieren miteinander und bilden ein Mikrofilament (F-Aktin). Im Filament wird ATP hydrolysiert, jedoch bleiben ADP und Pi zunächst gebunden⁵². Erst nach der Dissoziation des Phosphates dissoziieren auch die einzelnen Aktinmoleküle voneinander. Diese kurze Beschreibung der namensgebenden Proteine zeigt, dass ASKHA-Proteine unterschiedliche Aufgaben und auch unterschiedliche Mechanismen besitzen. Das wird unter anderem durch wenig sequenzzhomologe Bereiche und eine unterschiedliche Anzahl von Aminosäuren in den Sekundärstrukturen der $\beta\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$ -Topologie erreicht.

1.3.1 ATP-abhängige Benzoyl-CoA-Reduktasen

Die Benzoyl-CoA-Reduktasen (BCR) werden in die ATP-abhängige Klasse 1 und ATP-unabhängige Klasse 2 BCRs unterteilt. Der Mechanismus der ATP-unabhängigen Benzoyl-CoA-Reduktasen basiert auf der Elektronenbifurkation⁵³ (beschrieben im Abschnitt 1.2). Daher werden im Folgenden die ATP-abhängigen Benzoyl-CoA-Reduktasen näher thematisiert. Diese sind der Lage Benzoyl-CoA unter der Hydrolyse von zwei ATP-Molekülen zu Cyclohexa-1,5-diene-1-carbonyl-CoA zu reduzieren^{54,55}. Dabei werden schrittweise zwei Elektronen auf

Benzoyl-CoA übertragen, wobei der erste Elektronentransfer ratenlimitierend ist⁵⁶. Um Benzoyl-CoA zu Cyclohexa-1,5-dienoyl-CoA zu reduzieren, muss ein Redox-Potential von -622 mV erreicht werden, was zu den niedrigsten biologischen Produkt/Substrat-Redox-Potentialen zählt⁵⁷. Durch den Transfer eines Elektrons entsteht ein Anionradikal⁵⁸, welches durch das π -Elektronensystem stabilisiert wird. Nach Protonierung wird die Reaktion wiederholt, wodurch Cyclohexa-1,5-diene-1-carbonyl-CoA entsteht (Abb. 1-4 A). Dieses kann z. B. im anaeroben Metabolismus von *Thauera aromatica* zu drei Acetyl-CoA umgesetzt werden⁵⁹.

Klasse-1- Benzoyl-CoA-Reduktasen sind Heterotetramere aus den Untereinheiten A, B, C und D. Die Untereinheiten A und D besitzen eine ASKHA-Domäne⁶⁰, können also jeweils ein ATP binden, und sind über ein [4Fe4S]-Cluster miteinander verbunden. Die Untereinheiten B und C besitzen jeweils ein [4Fe4S]-Cluster⁶⁰ (Abb. 1-4 B).

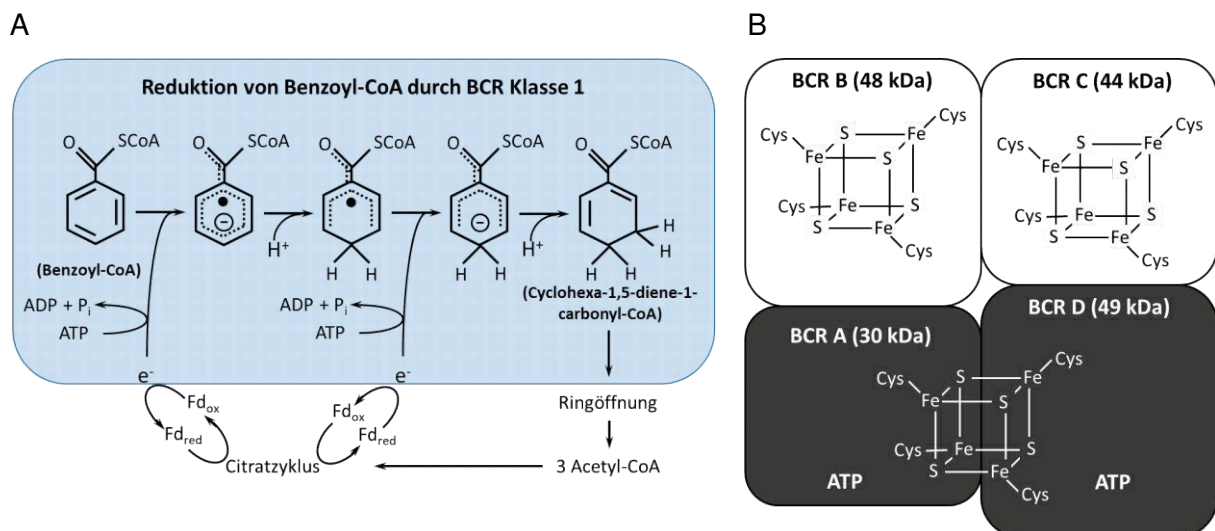


Abbildung 1-4. Reaktionsmechanismus und Aufbau der ATP-abhängigen Benzoyl-CoA-Reduktase. A) Rolle der ATP-abhängigen Benzoyl-CoA-Reduktase im Stoffwechsel von *Thauera aromatica*. Blau hinterlegt ist die ATP-abhängige Reduktion von Benzoyl-CoA zu Cyclohexa-1,5-diene-1-carbonyl-CoA (Abbildung erstellt nach Dörner und Boll⁵⁹ und Rabus et al.⁶¹). B) Schematische Darstellung der Untereinheiten und Cofaktoren der ATP-abhängigen Benzoyl-CoA-Reduktasen. Die Untereinheiten, welche die Substratreduktion durchführen, sind weiß und die Untereinheiten für die ATP-Bindung sind in schwarz dargestellt (Abbildung erstellt nach Boll⁶⁰).

Der Katalyse-Zyklus beginnt mit der Bindung von einem ATP. Dadurch erhöht sich die Reduktionsrate von einem oder mehreren [4Fe4S]-Clustern, ohne dass sich das Redox-Potential ändert⁶². Anschließend kommt es zu einer Konformationsänderung, was die Bindung von Benzoyl-CoA und dem zweiten ATP induziert. Nach der Reduktion durch ein zweites Elektron wird der Elektronentransfer durch die ATP-Hydrolyse eingeleitet^{55,62}. Dabei wird die Untereinheit C phosphoryliert⁶³. Durch die Dissoziation der Phosphatgruppe ändert sich der

Spin eines Elektrons von $S=1/2$ zu $S=7/2$, was höchst wahrscheinlich das Redox-Potential stark verringert^{54,63} und den Elektronentransfer auf das Benzoyl-CoA ermöglicht.

1.3.2 Aktivator der (R)-2-Hydroxyacyl-CoA-Dehydratasen

(R)-2-Hydroxyacyl-CoA-Dehydratasen ermöglichen es verschiedenen anaeroben Bakterien proteinogene Aminosäuren als Substrate zur Energiegewinnung nutzen. Sie katalysieren nach Desaminierung und (R)-2-Hydroxyacyl-CoA-Bildung die β,α -Eliminierung von Wasser zu Enoyl-CoA⁶⁴. Dabei wird zunächst die Carbonylgruppe des Thioesters reduziert, sodass ein Ketylradikal entsteht. Nach der syn-Eliminierung von Wasser wird das Elektron zurück auf die Dehydratase übertragen und kann für eine erneute Reduktion verwendet werden⁶⁵ (Abb. 1-5). Die (R)-2-Hydroxyacyl-CoA-Dehydratasen sind Heterodimere, bestehend aus einer α - und β -Untereinheit, welche jeweils ein [4Fe4S]-Cluster besitzen. Interessanterweise ist nur das [4Fe4S]-Cluster der α -Untereinheit an der Substratreduktion beteiligt, wohingegen das [4Fe4S]-Cluster der β -Untereinheit zur Verwahrung des Elektrons zwischen den Reaktionen dient⁶⁶.

Die (R)-2-Hydroxyacyl-CoA-Dehydratasen können bis zu 10 000 Reaktionszyklen durchlaufen bevor sie durch einen ATP-abhängigen *uphill* Elektronentransfer durch den Aktivator reaktiviert werden müssen⁶⁷. Der Aktivator ist ein Homodimer, in welchem beide Monomere über ein [4Fe4S]-Cluster miteinander verbunden sind⁶⁸. Jedes Monomer besitzt ein ASKHA-Strukturmotiv für die Bindung von ATP⁶⁹. Es wird angenommen, dass die Bindung von ATP den Elektronentransfer induziert⁷⁰. Große strukturelle Konformationsänderungen des Aktivators durch Nukleotidbindung konnten hingegen nicht ermittelt werden⁶⁹. ADP und nicht-hydrolysierbare ATP-Analoga erhöhen jedoch die Interaktionen zwischen beiden Proteinen^{69,71}.

Proteine in einem Stoffwechselweg direkt auf einander folgen. Hier wird in einem ersten Schritt methyliertes Coenzym F gebildet, welches anschließend als Methylgruppendonor für die Synthese von Acetyl-CoA genutzt werden kann⁸⁵.

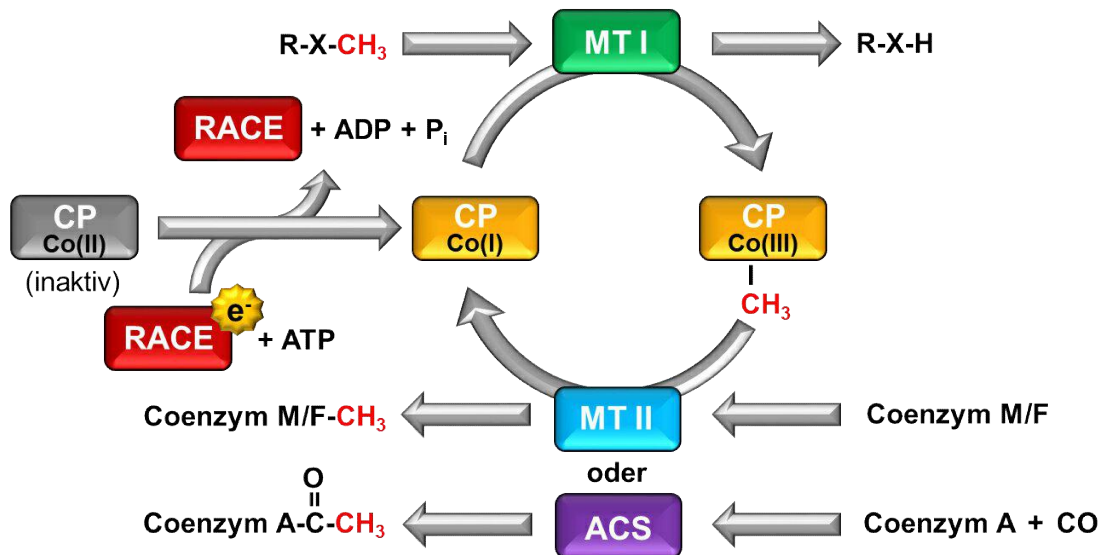


Abbildung 1-6. Mechanismus des Cobalamin-abhängigen Methylgruppentransfers. Die beteiligten Protein sind wie folgt abgekürzt: RACE-Protein (RACE), Methyltransferase I (MT I), Methyltransferase II (MT II), Corrinoide-Protein (CP) und Acetyl-CoA-Synthase (ACS). Die Abbildung wurde erstellt nach^{86,87}.

Corrinoide-Proteine sind nicht immer auf einzelne Methyltransferasen beschränkt. So kann z. B. MtqC durch Interaktionen mit verschiedenen Methyltransferasen L-Prolin-Betain oder L-Carnitin als Methylgruppendonor nutzen^{85,88}. Die große Substratvielfalt macht Corrinoide-Proteine auch interessant für die chemische Industrie. Bei chemischen Synthesen könnten die Demethylierungsreaktionen die Entfernung von Schutzgruppen unter milden Bedingungen ermöglichen⁸⁷.

Durch Oxidation können Corrinoide-Proteine jedoch in einen inaktiven Kobalt(II)-Zustand übergehen. Wie bereits erwähnt, kann die Reaktivierung durch RACE-Proteine erfolgen. Die Gruppe der RACE-Proteine wurde 2009 das erste Mal durch Schilhabel et al. definiert⁸⁹. Sie konnten durch Sequenzidentitätsanalysen verschiedene Gene anaerob lebender Bakterien und Archaeen dieser Proteinklasse zuordnen. Dabei zeigte sich, dass die analysierten Gene der bakteriellen RACE-Proteine fast ausschließlich Gensequenzen für N-terminale [2Fe2S]-Cluster besitzen, während Archaeen Gensequenzen C-terminaler [4Fe4S]-Cluster aufwiesen. Beide Regionen besaßen jedoch eine hohe Sequenzidentität mit Ferredoxin⁸⁹.

Schon 1993 konnten Daas et al. die ATP-gekoppelte Aktivierung eines Corrinoide-Proteins von *Methanosarcina barkeri* dem **Methyltransferase Activation Protein** (MAP) zuordnen⁷². MAP

wird durch ATP autophosphoryliert und kann anschließend die Komplexbildung des Co^{2+} innerhalb des Corrino-Proteins verändern^{90,91}. Es wird angenommen, dass MAP die Koordination des Kobalt-Ions vom *base-on*- in den *base-off*-Zustand ändert und so die Reduktion durch ein zusätzliches Ferredoxin ermöglicht. Im *base-on*-Zustand wird das Kobalt-Ion vom 5,6-Dimethyl-benzimidazol-Ring des Cobalamins koordiniert⁹². Das Redox-Potential für die $\text{Co}^{2+}/\text{Co}^{+}$ -Reduktion kann sich durch Unterbrechung dieser Koordination (*base-off*-Zustand) um ca. 100 mV erhöhen⁹³. MAP ist ein Heterodimer und besitzt keinen gebundenen Cofaktor⁹⁰. Damit unterscheidet es sich stark von anderen bekannten RACE-Proteinen. Mit RamA konnte ein weiteres RACE-Protein in *Methanosarcina barkeri* identifiziert werden⁷³. RamA besitzt eine C-terminale Ferredoxin-Domäne mit einem [4Fe4S]-Cluster für den Elektronentransfer und kann die Monomethylamin-, Dimethylamin- und Trimethylamin-Methyltransferase aktivieren. Auch RamQ, das RACE-Protein von *Eubacterium limosum* (abweichend auch ELI_0370 genannt), kann verschiedene Corrino-Proteine aktivieren. Es besitzt ein [2Fe2S]-Cluster und katalysiert die Reduktion der Proteine MtqC und ELI_2004^{74,88}. Das RACE-Protein von *Acetobacterium dehalogenans* besitzt ein N-terminales [2Fe2S]-Cluster mit einem Mittelpunktspotential von -290 mV. Es kann durch den ATP-gekoppelten *uphill* Elektronentransfer unter anderem die Vanillat-O-Demethylase mit einem $\text{Co}^{2+}/\text{Co}^{+}$ -Mittelpunktspotential von kleiner als -450 mV aktivieren⁷⁵. Kinetische Studien zeigen, dass Ammonium- und Kalium-Ionen für den Elektronentransfer nicht essentiell sind, aber die *turnover number* k_{cat} erhöhen können⁹⁴. Hohe ATP-Konzentrationen oder die Anwesenheit nicht-hydrolysierbarer ATP-Analoga wirken hingegen inhibierend. AMP, ADP und GTP konnten keinen Elektronentransfer induzieren⁷⁵. Für den Transfer eines Elektrons wird ein ATP-Molekül hydrolysiert⁹⁴. Interaktionsanalysen legen nahe, dass das RACE-Protein ein Homodimer bildet, in welchem eine Untereinheit je ein Corrino-Protein binden kann⁹⁵. Neben der Vanillat-O-Demethylase kann das RACE-Protein auch die Veratrol-, Syringate und Guajacol-O-Demethylase aktivieren.

1.3.3.1 Der Reductive Activator of CoFeSP (RACo)

Das **Corrino** **Iron (Fe) Sulfur Protein** (CoFeSP) steht im Zentrum des reduktiven Acetyl-CoA-Weges des gram-positiven Bakteriums *Carboxydotherrnus hydrogenoformans*. *Carboxydotherrnus hydrogenoformans* lebt anaerob und konnte erstmals aus heißen Quellen auf Kunashir isoliert werden konnte⁹⁶. Dementsprechend sind die Proteine des Organismus hitzestabil, aber viele auch sauerstoffempfindlich. Der reduktive Acetyl-CoA-Weg dient im Allgemeinen der CO_2 -Fixierung zur Kohlenstoffassimilation vieler anaerob lebender Bakterien und Archaeen und ist in einen Methyl-Zweig und einen Carbonyl-Zweig geteilt. CoFeSP verbindet beide Zweige über einen Methylgruppentransfer miteinander⁸⁶. Da dieser Transfer essentiell für den reduktiven Acetyl-CoA-Weg ist, gibt es dementsprechend homologe Proteine

mit gleicher oder ähnlicher Bezeichnung (CFeSP/CoFeS-P) in anderen anaerob lebenden Bakterien und Archaeen^{97–99}.

Im Methyl-Zweig des Stoffwechselweges wird methyliertes Coenzym F gebildet. Dazu wird CO₂ zunächst durch die Formiatdehydrogenase reduziert und in einer ATP-abhängigen Reaktion zunächst formyliertes Coenzym F gebildet. Dieses wird durch mehrere Reduktionsschritte zu methyliertem Coenzym F umgesetzt. Wie in Abschnitt 1.5 beschrieben kann das methylierte Coenzym F nun mit Hilfe einer Methyltransferase als Methylgruppendonor für das Corrinoid-Protein CoFeSP dienen (Abb. 1-6). Im Carbonyl-Zweig wird CO₂ durch die CO-Dehydrogenase zu CO reduziert. Die Acetyl-CoA-Synthase kann nun aus methyliertem CoFeSP, CO und Coenzym A Acetyl-CoA bilden⁸⁶.

RACo ist das RACE-Protein des reduktiven Acetyl-CoA-Weges von *Carboxydotherrhus hydrogeniformans* und derzeit das einzige RACE-Protein mit bekannter Proteinstruktur⁷⁷. Auch die Proteinstrukturen von CoFeSP und des CoFeSP:RACo-Komplexes konnten aufgeklärt werden und geben Hinweise auf den möglichen Mechanismus des ATP-gekoppelten *uphill* Elektronentransfers^{84,100}. CoFeSP ist ein Heterodimer und besteht aus der großen Untereinheit CfsA und der kleinen Untereinheit CfsB¹⁰¹. CfsB besteht aus einer Domäne mit einer (β α)₈-*barrel*-Struktur. CfsA besteht aus drei Domänen, wobei die mittlere Domäne ebenfalls ein (β α)₈-*barrel* ausweist. Die N-terminale Domäne besitzt ein [4Fe4S]-Cluster, während die C-terminale Domäne das Cobalamin bindet. Beide terminalen Domänen sind über *linker*-Regionen mit der mittleren Domäne verbunden⁸⁴. Diese *linker*-Regionen ermöglichen CoFeSP große Konformationsänderung bei der Komplexbildung mit RACo. Die N-terminale Domäne bewegt sich um 42 Å und interagiert stark mit RACo. Die C-terminale Domäne dreht sich um 45° und bewegt sich ebenfalls in Richtung von RACo. Hier bildet sich eine Bindetasche für das Cobalamin zwischen beiden Proteinen aus, in welcher die Reste des Corrin-Ringes stärker mit RACo interagieren als mit CoFeSP¹⁰⁰.

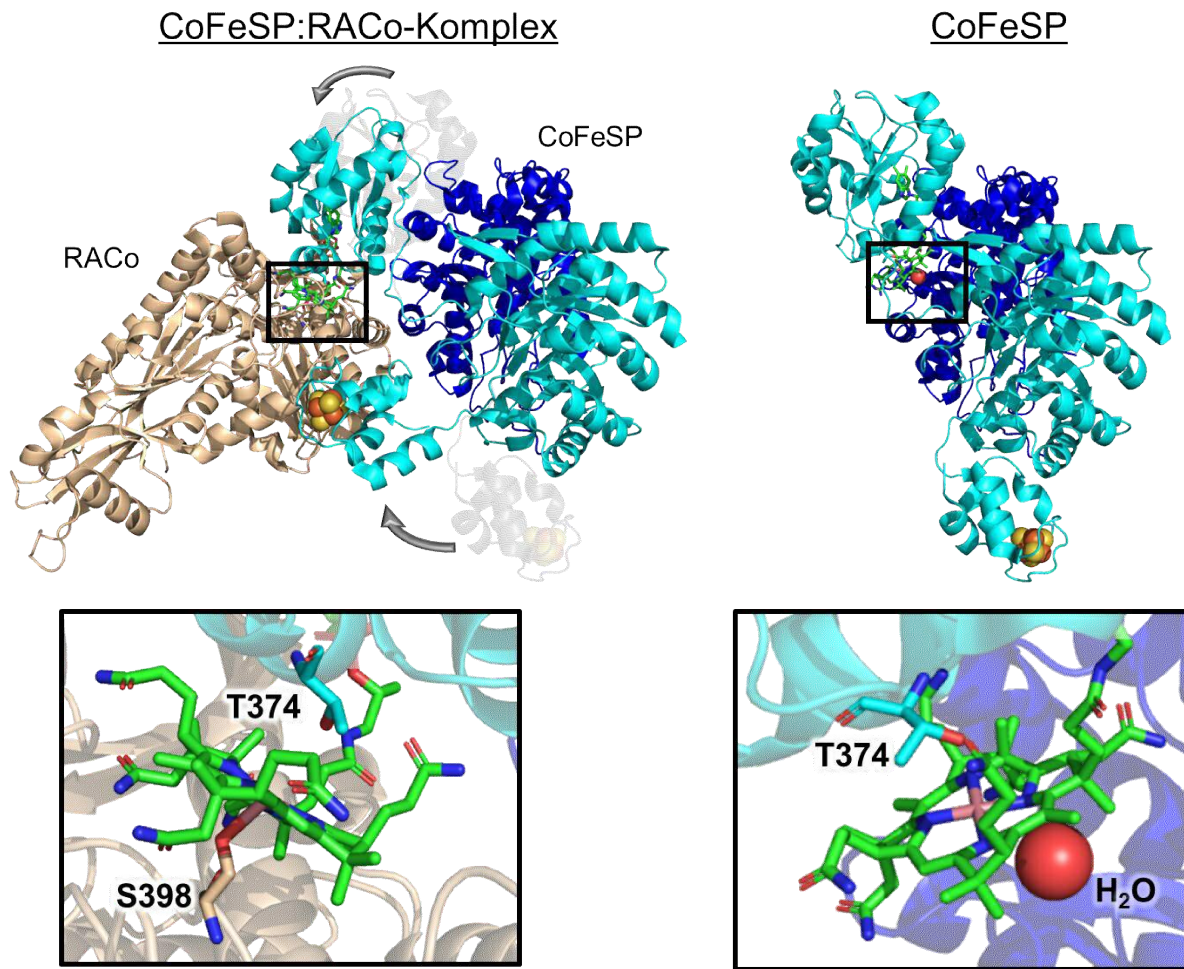


Abbildung 1-7. Bändermodell von CoFeSP und dem CoFeSP:RACo-Komplex. Die Untereinheiten von CoFeSP sind in cyan (CsfA) und dunkelblau (CfsB) und RACo ist in pink dargestellt. Die eingezeichneten Pfeile und transparent-hinterlegten Strukturen deuten die durch die Komplexbildung bedingten Konformationsänderungen an. Das Cobalamin und die Aminosäuren S398 und T374 sind als Stäbchenmodell gezeigt. Die Atome des [4Fe4S]-Clusters von CoFeSP (Schwefel in gelb und Eisen in orange) und ein Co^{2+} -koordinierendes Wassermolekül (rot) sind in Kugeln dargestellt. Die Abbildung wurde mit PyMOL™ erstellt und die PDB-Nummern der Proteine sind: CoFeSP: 2YCL⁸⁴; CoFeSP:RACo-Komplex: 4C1N¹⁰⁰.

Das Kobalt des Cobalamins befindet sich im CoFeSP:RACo-Komplex als auch in der CoFeSP-Struktur in der *base-off/His-off*-Konformation¹⁰². Das heißt, es wird weder vom 5,6-Dimethylbenzimidazol-Ring des Cobalamins noch von einem Histidin-Rest koordiniert. Das T374 ist die Aminosäure von CfsA, welche in beiden Strukturen den geringsten Abstand zum Kobalt aufweist. Nur das S398 von RACo zeigt im Komplex mit 2,5 Å eine größere Nähe¹⁰⁰. Dabei verdrängt es ein Co^{2+} -koordinierendes Wassermolekül. Interessanterweise verringert sich das Redox-Potential der $\text{Co}^{2+}/\text{Co}^{+}$ -Reduktion durch die Komplexbildung von -450 mV auf -600 mV und die Elektronendichte des Kobalts ändert sich in die Richtung der $\text{Co}^{2+}/\text{Co}^{3+}$ -Oxidation^{103,104}.

Auch RACo zeigt große strukturelle Änderungen durch die Interaktionen mit CoFeSP. RACo ist ein Homodimer, wobei jede Untereinheit aus einer Ferredoxin-Domäne mit einem [2Fe2S]-Cluster, *linker*-Region, Mitteldomäne und ASKHA-Domäne besteht⁷⁷. Die N-terminale Ferredoxin-Domäne ist durch die *linker*-Region sehr beweglich, daher konnte sie in der Kristallstruktur von RACo nur bei einer Untereinheit und in der Struktur des CoFeSP:RACo-Komplexes in keiner lokalisiert werden. Die Mitteldomäne vermittelt die Interaktionen der Untereinheiten zur Dimerisierung. Die ASKHA-Domäne zeigte eine geschlossene Konformation mit einem gebundenen Phosphat und Magnesium-Ion. Durch die Bindung von CoFeSP öffnet sich die ASKHA-Domäne, sodass in der Struktur des CoFeSP:RACo-Komplexes kein Phosphat und Magnesium-Ion mehr detektiert werden konnte.

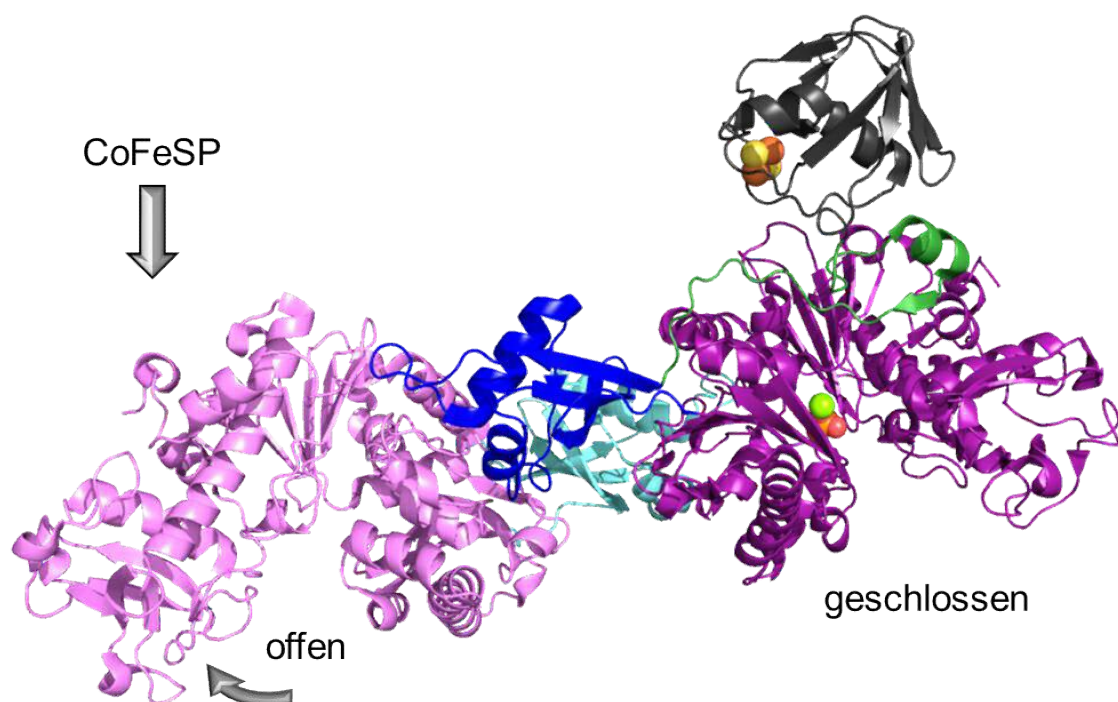


Abbildung 1-8. Bändermodell von RACo. Die Abbildung zeigt die strukturellen Veränderungen von RACo (PDB-Nummer: 3ZYY⁷⁷) durch die Komplexbildung mit CoFeSP (PDB-Nummer: 4C1N¹⁰⁰). Die Ferredoxin-Domäne ist in schwarz, die Linker-Domäne in grün, die Dimerisierungsdomänen in dunkelblau und cyan und die ASKHA-Domänen in lila und pink gezeigt. Die eingezeichneten Pfeile deuten die Öffnung der ATP-Bindungstasche und die Interaktionen zu CoFeSP an. In der geschlossen Form befindet sich ein Orthophosphat und ein Magnesium-Ion in der ATP-Bindungstasche. Die Atome des [2Fe2S]-Clusters und des Orthophosphates und das Magnesium-Ion sind als Kugeln dargestellt. Die Abbildung wurde mit PyMOLTM erstellt.

Der Mechanismus des ATP-gekoppelten *uphill* Elektronentransfers konnte noch nicht vollständig aufgeklärt werden. RACo zeigt starke Interaktionen zum inaktiven Kobalt(II)-CoFeSP, nicht aber zum methyliertem Kobalt(III)-CoFeSP oder reduziertem Kobalt(I)-CoFeSP⁷⁷. Zur Vereinfachung werden im Folgenden Kobalt(I)-CoFeSP als Co(I)FeSP, Kobalt(II)-CoFeSP als Co(II)FeSP und Kobalt(III)-CoFeSP als Co(III)FeSP bezeichnet. Die Struktur des Proteinkomplexes deutet an, dass dem Serin 398 eine besondere Rolle bei der Erkennung des Redox-Zustands zukommt. Kinetische Experimente deuten an, dass nach einer schnellen Assoziation der Proteine, es zu langsameren strukturellen Veränderung innerhalb des Komplexes kommt¹⁰⁵. Des Weiteren erhöht die Komplexbildung die Rate der basalen ATP-Hydrolyse von RACo, wahrscheinlich durch die Öffnung der ATP-Bindungsdomäne¹⁰⁰. Für den Elektronentransfer konnten Raten von $0,089 \text{ min}^{-1}$ bei $0,1 \text{ mM}$ ATP bis $0,288 \text{ min}^{-1}$ bei 2 mM ATP gemessen werden, was in etwa der Rate der ATP-Hydrolyse entspricht^{77,100}. Eine Bestimmung des K_D -Wertes zur ATP-Bindung und der limitierenden Rate des Elektronentransfers steht hingegen noch aus. Darüber hinaus ist noch nicht bekannt, ob die ATP-Bindung oder die ATP-Hydrolyse den Elektronentransfer induziert. Dieser zeigt eine Abhängigkeit von Magnesium- und Kalium-Ionen⁷⁷. Ob weitere Ionen unterstützend auf den Elektronentransfer wirken können und was ihre mechanistischen Funktionen sind, ist jedoch noch unerforscht. Es bleibt auch offen, was nach der erfolgten Reaktion den Rücktransfer des Elektrons auf das $[2\text{Fe}_2\text{S}]$ -Cluster von RACo verhindert.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Der Mechanismus des ATP-gekoppelten *uphill* Elektronentransfers der RACE-Proteine ist noch in weiten Teilen unbekannt. RACo und CoFeSP bilden auf Grund der bereits definierten Proteinstrukturen eine vielversprechende Grundlage für weitere Analysen. Am Beispiel der Nitrogenase konnten unter anderem durch Verknüpfung von strukturellen Daten mit kinetischen Parametern tiefere Einblicke in den Mechanismus des Proteinkomplexes gewonnen werden.

Daher soll im Rahmen dieser Arbeit der ATP-gekoppelte *uphill* Elektronentransfer zwischen RACo und CoFeSP an Hand von kinetischen Messungen näher untersucht werden. Dazu sollen zunächst die rekombinante Genexpression und die Reinigungsstrategie der Proteine verbessert werden, um einen Cofaktorgehalt von annähernd 100 % zu erreichen. Darüber hinaus sollen die Reaktionsbedingungen zur Messung des Elektronentransfers optimiert werden. Dadurch können Aussagen über die Effizienz des Elektronentransfers getroffen und ungewollte oder nur schwer interpretierbare Nebenreaktionen minimiert werden. Zudem soll die Aufgabe der ATP-Bindung und -Hydrolyse näher charakterisiert werden. In beiden Fällen könnte sowohl der Elektronentransfer als auch die Komplexdissoziation induziert werden. Des Weiteren ist ungeklärt, wie nach erfolgtem *uphill* Elektronentransfer der mögliche exergonische Elektronentransfer von Co(I)FeSP auf RACo^{ox} unterbunden wird. Die bisherigen Daten sprechen dafür, dass die Dissoziation des Komplexes hierfür eine entscheidende Rolle spielt. Aus den ermittelten Daten soll dann abschließend ein möglicher Reaktionsmechanismus für den ATP-gekoppelten *uphill* Elektronentransfer von RACo und CoFeSP erstellt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien stammten von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), AppliChem (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) und besaßen mindestens einen analytischen Reinheitsgrad. Stickstoff (99,99 %) und Formiergas (95 % N₂; 5 % H₂) wurden von der Firma Air Liquide (Berlin) bezogen.

2.2 Nährmedien

Für die Herstellung von Nährmedien wurde destilliertes Wasser verwendet und die Medien anschließend autoklaviert. Die Herstellung von Puffer erfolgte ausschließlich mit bidestilliertem Wasser. Alle Puffer wurden unter Verwendung eines Filtertrichters und eines Membranfilters (Porengröße 0,22 µm) filtriert (20 min bei 121 °C und 2 bar).

<u>LB-Medium</u>	<u>TB-Medium</u>	<u>SOB-Medium / LB-Agar</u>
10 g/l Trypton	12 g/l Trypton	Beides wurde als
5 g/l Hefeextrakt	24 g/l Hefeextrakt	Trockenmischung der
10 g/l NaCl	4 ml/l Glycerol	Firma Roth (Karlsruhe)
	12,3 g/l K ₂ HPO ₄	bezogen und nach
	2,2 g/l KH ₂ PO ₄	Herstellerangaben
		angesetzt.

Für die Herstellung des TB-Mediums wurden die Kaliumsalze in 10-fach konzentrierter Lösung getrennt von den anderen Zusätzen autoklaviert und abschließend in das Medium gegeben.

2.3 Bakterienstämme und Antibiotika

<i>E. coli</i> DH5α (Novagen, Darmstadt)	F– $\phi 80 \Delta lacZ \Delta M15 \Delta (lacZYA-argF)U169$ <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (rk–, mk+), <i>phoA supE44</i> λ – <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) (Novagen, Darmstadt)	F– <i>ompT hsdSB</i> (rB– mB–) <i>gal dcm</i> (DE3)
<i>E. coli</i> Rosetta (DE3) (Novagen, Darmstadt)	F– <i>ompT hsdSB</i> (rB– mB–) <i>gal dcm</i> (DE3) pRARE2 (CamR)

Für die Kultivierung der Bakterien und Herstellung der LB-Selektivagar-Platten wurden folgende Antibiotika in den angegebenen Konzentrationen verwendet:

Carbenicillin	100 µg/ml
Chloramphenicol	50 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml
Tetrazyklin	50 µg/ml

2.4 Anoxisches Arbeiten

Mit Ausnahme der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, der Proteinkonzentrationsbestimmung und der *stopped-flow*-Spektroskopie wurden alle Arbeiten, in welchen die Proteine RACo, CoFeSP oder MDCC-PBP involviert waren, in einem anoxischen Handschuhkasten Vinyl-Anaerobic-Chamber Model B™ (COY Laboratory, Grass Lake) unter einer Atmosphäre von 95 % N₂ und 5 % H₂ durchgeführt. Die *stopped-flow*-Spektroskopie wurde unter anoxischen Bedingungen nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Flüssigkeiten wurden mit Butylgummisepten verschlossen und der Sauerstoff durch zyklisches Entgasen und Einleiten von Stickstoff (mindestens 7 Zyklen jeweils 15 min) weitestgehend entfernt.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 DNA-Hydrolyse mittels Restriktionsendonukleasen

Für die Hydrolyse von PCR-Fragmenten und Plasmid-DNA wurden Restriktionsenzyme der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet.

2.5.2 Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte unter Verwendung der T4-DNA-Ligase der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA). Bei einem Gesamtvolumen von 20 µl wurden 30 fmol Vektor-DNA und 90 fmol Fragment-DNA mit 1 Weiss U T4-DNA-Ligase nach Herstellerangaben bei 6 °C über Nacht inkubiert.

2.5.3 Agarosegelelektrophorese

Es wurden 0,5 mg Agarose in 50 ml TAE-Puffer durch Erhitzen gelöst. Nach Abkühlen auf 60 °C wurden 3 µl Midori Green Advance DNA Stain™ (Nippon Genetics Europe GmbH, Düren) zu der Lösung gegeben und in die Gelkammer gegossen. Die DNA-Proben wurden mit

6x DNA Loading Dye™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) versetzt und nach Verfestigung des Gels in die Geltaschen überführt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für 20 min bei einer Spannung von 140 V. Die DNA-Banden wurden unter UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht und die Anzahl der Basenpaare durch Mitführen des GeneRuler 1 kb DNA Ladder™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bestimmt.

TAE-Puffer

50 mM Tris

50 mM Essigsäure

1 mM EDTA

2.5.4 Plasmidpräparation

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte unter Verwendung des NucleoSpin Plasmid™ (Macherey-Nagel, Düren) aus 5 ml inokuliertem LB-Medium. Abweichend der Angaben des Herstellers wurden die Plasmide mit 40 µl ddH₂O eluiert.

2.5.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Genfragmente wurden nach Herstellerangaben mit Hilfe des Phusion High-Fidelity PCR Master Mix™ (New England Biolabs, Ipswich) amplifiziert.

Verwendete Primer:

raco_for	CAG CCA TAT GGC AGA ATA TAA AGT TTT G
raco_rev	GGT GCT CGA GTT ATT CTA CTG AAG
cfsB_for	TAA GAA GGA GAT ATA CCA TGG GC
cfsB_rev	GAT GAG CTC GAG TTA GAC ATT CCA GCG TTG
cfsA_for	ATC ATA AGA TCT CCA TCA TCA TCA TCA CG
cfsA_rev	GCG GTT TCT TTA CCA GAC TCG AG

2.5.6 Dephosphorylierung von linearisierten Vektoren

Um bei einer Ligationsreaktion den Vektorschluss ohne Insert zu vermeiden wurde die FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.5.7 Reinigung von PCR-Produkten und Elution von DNA aus Agarosegelen

In beiden Fällen wurde NucleoSpin Gel and PCR Clean-up™ (Machery-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben genutzt.

2.5.8 Klonierung

Mit Ausnahme des Gens *acsC* wurden alle verwendeten Gene in den Expressionsvektor pET-28a-His/TEV kloniert. Dieser enthielt Sequenzen, welche für einen N-terminalen Hexahistidin-*tag* (His₆-*tag*) und eine Peptiderkennungssequenz für die Tobacco-Etch-Virus (TEV)-Endopeptidase codieren. Bei der Expression entstand so ein Fusionsprotein, was N-terminal durch den His₆-*tag* und der TEV-Protease-Spaltungs-Sequenz verlängert war. Dies ermöglichte die Reinigung der Proteine mittels Nickel-Affinitätschromatographie. Der His₆-*tag* konnte durch die Erkennungssequenz für die TEV-Endopeptidase proteolytisch abgespalten werden. Dadurch entstanden rekombinante Proteine, welche sich durch ein zusätzliches N-terminales Glycin von der nativen Proteinsequenz unterschieden.

Die Gene wurden mittels PCR amplifiziert. Anschließend wurden die Fragmente mit Hilfe des NucleoSpin Gel and PCR Clean-up™ gereinigt und mit Restriktionsendonukleasen hydrolysiert. Im Falle des Gens *PstS* wurde der Vektor pET22b_PstS_1 (Addgene, Watertown, USA) hydrolysiert, um das DNA-Fragment zu erhalten. Für die Abtrennung der Nukleasen und die Analyse der DNA-Fragmente wurden die Proben mit einem 1 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Die Expressionsvektoren wurden mit Restriktionsendonukleasen und zusätzlich mit der FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) behandelt. Sowohl die DNA-Fragmente als auch der hydrolysierte Expressionsvektor wurden im Anschluss mit dem NucleoSpin Gel and PCR Clean-up™ (Machery-Nagel, Düren) gereinigt. Abschließend wurden die Gene in den jeweiligen Expressionsvektor ligiert und in *Escherichia coli* DH5α-Zellen transformiert. Von den transformierten Zellen wurde eine Kolonie in 5 ml LB-Medium kultiviert. Nach der Präparation wurden die Plasmide von der Firma Eurofins Scientific (Ebersberg) sequenziert. Eine Übersicht über die verwendeten Gene, Ursprungsvektoren, Zielvektoren, Primer und Restriktionsendonukleasen ist in Tabelle 2-1 zu sehen.

Tabelle 2-1. Übersicht der verwendeten DNA und Restriktionsendonukleasen für die Klonierung der angegebenen Gene.

Gen	Ursprungsvektor	Zielvektor	Primer	Restriktionsendonukleasen
<i>orf7</i>	pPKCoDuet1 (AG Dobbek)	pET-28a-His/TEV (AG Dobbek)	raco_for raco_rev	<i>NdeI</i> <i>XhoI</i>
<i>acsC</i>	pPKCD (AG Dobbek)	pET15b	cfsA_for cfsA_rev	<i>NcoI</i> <i>XhoI</i>
<i>acsD</i>	pPKCD (AG Dobbek)	pET-28a-His/TEV (AG Dobbek)	cfsB_for cfsB_rev	<i>NdeI</i> <i>XhoI</i>
<i>psts</i>	pET22b_PstS_1 (Addgene)	pET-28a-His/TEV (AG Dobbek)		<i>NdeI</i> <i>XhoI</i>

2.6 Mikrobiologische Methoden

2.6.1 Transformation

2.6.1.1 Transformation chemisch-kompetenter Zellen

1 µl Plasmid-DNA (50 – 100 ng/µl) wurde zu 200 µl chemisch-kompetenter Zellen gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für 45 s wurden die Zellen für 3 min auf Eis gelagert. Anschließend wurde 1 ml SOB-Medium zugesetzt und der Ansatz für 60 min bei 37 °C unter Schütteln kultiviert. Auf eine LB-Selektivagar-Platte wurden 50 µl gegeben, ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

2.6.1.2 Transformation elektrisch-kompetenter Zellen

Für die simultane Transformation von zwei unterschiedlichen Plasmiden wurden auf Grund der höheren Kompetenz elektrisch-kompetente Zellen verwendet. Hier wurde je 1 µl der jeweiligen Plasmid-DNA zu 200 µl kompetenter Zellen gegeben. Die Transformation erfolgte durch das Anlegen einer Spannung von 2500 V. Unmittelbar danach wurden die Zellen mit 1 ml auf 37 °C erwärmtes SOB-Medium gemischt und bei 37 °C für 1 h kultiviert. Die Zellen wurden bei 5000 g für 1 min pelletiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in 100 µl SOB-Medium resuspendiert. Diese 100 µl wurden auf LB-Selektivagar ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

2.6.2 Rekombinante Genexpression in *Escherichia coli*

Für die rekombinante Genexpression wurde die Plasmid-DNA wie im Abschnitt 2.6.1 beschrieben in den jeweiligen Expressionsstamm transformiert. Eine Einzelkolonie wurde in

50 ml LB-Medium inokuliert und für 16 h bei 37 °C und 140 rpm kultiviert. Von dieser Vorkultur wurden 30 ml in 2 l TB-Medium überführt und bis zur gewünschten optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) bei 37 °C und 120 rpm inkubiert. Die Induktion der rekombinanten Genexpression erfolgte durch Zugabe von 1 mM Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) nach einer 20-minütigen Inkubation auf Eis. Im Falle einer Expression eines Eisen-Schwefel-Cluster-Proteins wurde die Expressionskultur zusätzlich mit 0,3 mM $FeSO_4$ und 0,3 mM Na_2S supplementiert und diese Konzentration 2 h nach IPTG-Zugabe auf 0,6 mM erhöht. Abschließend wurden die Zellen bei 20 °C und 120 rpm für 20 h kultiviert und mittels Zentrifugation (Avanti J-20 Zentrifuge™, Beckman Coulter GmbH, Krefeld) bei 6000 rpm für 20 min geerntet.

2.7 Proteinreinigung

Alle verwendeten Puffer wurden filtriert und nach mindestens 7 Zyklen an der Vakuum-Gas-Anlage (Abschnitt 2.2) abschließend entgast. Die Zugabe von Reduktionsmitteln erfolgte erst unmittelbar vor der Nutzung des Puffers. Für alle chromatographischen Reinigungen wurde das System ÄKTA Purifier™ von GE Healthcare verwendet. Falls nicht anders beschrieben wurde nach Zellaufschluss als initialer Reinigungsschritt die immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) durchgeführt. Im Anschluss wurde das Eluat 1:10 mit Anionen-Laufpuffer verdünnt und mit β -Mercaptoethanol (Endkonzentration von 10 mM) und 1 mg His₆-TEV-Protease pro 100 mg Protein versetzt. Nach einer Inkubation bei Raumtemperatur über Nacht erfolgte eine IMAC mit gekoppelter Anionenaustauschchromatographie, um abgespaltene His₆-tag-Peptide, die His₆-TEV-Protease und nicht-hydrolysierte Fusionsproteine abzutrennen. Protein, welches keinen His₆-tag mehr besitzt, passiert die IMAC und interagiert nur noch mit dem Material der Anionenaustauschchromatographie. Das jeweilige Protein wurde eluiert und einer Größenausschlusschromatographie 120 ml Superdex 200 Prep Grade™ (GE Healthcare, Illinois, USA) unterzogen. RACo wurde mittels Amicon Ultra-15, PLTK Ultracel-PL Membran, 30 kDa™ auf 30 – 35 mg/ml und MDCC-PBP mittels Amicon Ultra-15, PLTK Ultracel-PL Membran, 10 kDa™ auf 4 – 5 mg/ml konzentriert. Beide Proteine wurden in flüssigem Stickstoff gefroren und in anaeroben Rotilabo-Kurzwindenfläschchen ND9™ bei -80 °C gelagert. CoFeSP wurde mit der Amicon Ultra-15, PLTK Ultracel-PL Membran, 10 kDa™ auf 20 – 25 mg/ml konzentriert und in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.7.1 Zellaufschluss

5 g Zellfeuchtmasse wurde in 50 ml Zellaufschlusspuffer resuspendiert, mit 0,1 mg/ml Lysozym (Applichem, Darmstadt) versetzt und 30 min unter Rühren inkubiert. Die Zellen wurden anschließend zweimal für 15 min mit Ultraschall (Bandelin Sonoplus™; Cycle:5; Power

50%) behandelt und unlösliche Zellbestandteile mit 30000 rpm für 30 min durch Zentrifugation (Beckman Coulter Optima L-80 XP Ultracentrifuge™; Rotor: Type 45 Ti™) abgetrennt.

Zellaufschlusspuffer

50 mM MOPS/NaOH pH 7,5

150 mM NaCl

2.7.2 Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC)

Da die rekombinant hergestellten Proteine einen N-terminalen Hexahistidin-*tag* besaßen, konnten die Proteine mit Hilfe der immobilisierten Metallchelate-Affinitätschromatographie gereinigt werden. Die verwendete Sepharose enthält immobilisierte Ni²⁺-Ionen, die mit dem His₆-*tag* koordinativ interagieren können. Die Elution des Proteins erfolgte durch eine Erhöhung der Imidazolkonzentration. Für die beschriebenen Reinigungen wurden Leersäulen der Firma Agarose Bead Technologies (Miami, USA) mit einem Volumen von 8 ml, 20 ml und 35 ml des Materials Ni Sepharose High Performance™ von GE Healthcare (Illinois, USA) verwendet.

Falls nicht anders beschrieben, wurde die Reinigung mittels IMAC nach folgender Methode durchgeführt:

Äquilibrieren:	3 Säulenvolumen IMAC-Laufpuffer
Laden des Zelllysates	
Waschen:	10 Säulenvolumen IMAC-Laufpuffer
Elution:	2 Säulenvolumen IMAC-Elutionspuffer
Flussgeschwindigkeit:	3 ml/min

IMAC-Laufpuffer

50 mM Tris/HCl pH 8

200 mM NaCl

20 mM Imidazol

IMAC-Elutionspuffer

50 mM Tris/HCl pH 8

200 mM NaCl

250 mM Imidazol

2.7.3 Anionenaustauschchromatographie

Alle in dieser Arbeit gereinigten Proteine besitzen einen isoelektrischen Punkt bei pH-Werten von unter 6. Da die verwendeten Puffer einen pH-Wert von mindestens 7,5 besaßen, waren die Nettoladungen der zu reinigenden Proteine negativ. Dieser Zustand ermöglichte die Anwendung einer Anionenaustauschchromatographie. Die negativ geladenen Proteine interagieren mit dem positiv geladenen Säulenmaterial. Durch Erhöhung der

Ionenkonzentration können die gebundenen Proteine vom Säulenmaterial verdrängt und somit eluiert werden. Für diesen Reinigungsschritt wurde eine 9 ml-Leersäule der Firma Agarose Bead Technologies (Miami, USA), Q Sepharose Fast Flow™ (GE Healthcare, Illinois, USA) und folgende Methode verwendet:

Äquilibrieren:	3 Säulenvolumen AAC-Laufpuffer
Laden des Zelllysates	
Waschen:	2 Säulenvolumen AAC-Laufpuffer
Elution:	2 Säulenvolumen AAC-Elutionspuffer
Flussgeschwindigkeit:	2 ml/min

AAC-Laufpuffer

50 mM Tris/HCl pH 8
10 mM NaCl

AAC-Elutionspuffer

50 mM Tris/HCl pH 8
600 mM NaCl

2.7.4 Größenausschlusschromatographie

Bei dieser Chromatographie geschieht die Auftrennung der Moleküle nach ihrem hydrodynamischen Radius. Das Säulenmaterial enthält Poren, in welche die Moleküle je nach Größe ihres hydrodynamischen Radius unterschiedlich tief diffundieren können. Dadurch entstehen verschiedene Retentionszeiten. Die Vorgehensweise bei diesem Reinigungsschritt war:

35 ml Sephadex G-25™ (GE Healthcare, Illinois, USA)

Äquilibrieren:	2 Säulenvolumen GAC-Laufpuffer
Laden des Zelllysates	
Flussgeschwindigkeit:	5 ml/min

120 ml Superdex 200 Prep Grade™ (GE Healthcare, Illinois, USA)

Äquilibrieren:	1,5 Säulenvolumen GAC-Laufpuffer
Laden des Zelllysates	
Flussgeschwindigkeit:	1 ml/min

GAC-Laufpuffer

50 mM MOPS/NaOH pH 7,5
150 mM NaCl

2.8 Proteinbiochemische und biophysikalische Methoden

2.8.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde nach Laemmli durchgeführt¹⁰⁶. Dabei wurden die Proben mit 5x SDS-Probenpuffer und 5 min bei 100 °C denaturiert. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung 175 V für 55 min. Für alle Analysen wurden 12 %ige Polyacrylamidgele und als Größenreferenz der PageRuler Prestained Protein Ladder™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) verwendet. Zur Färbung der Proteine wurden die Polyacrylamidgele über Nacht in Färbelösung inkubiert und abschließend die Hintergrundfärbung mit Entfärbungslösung entfernt.

<u>Sammelgel</u>	<u>Trenngel</u>	<u>5 x SDS-Probenpuffer</u>
16,5 % (v/v) Rotiphorese	40 % (v/v) Rotiphorese	313 mM Tris/HCl pH 6,8
Gel 30™ (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)	Gel 30™ (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)	50 % (v/v) Glycerol
125 mM Tris/HCl (pH 6.8)	375 mM Tris/HCl pH 8.8	10 % (v/v) SDS
0,1 % (w/v) SDS	0,1 % (w/v) SDS	5 % (v/v) β-Mercaptoethanol
0,08 % (v/v) TEMED	0,08 % (v/v) TEMED	0,1 % (v/w)
0,05 % (w/v) APS	0,05 % (w/v) APS	Bromphenolblau
<u>Laufpuffer</u>	<u>Färbelösung</u>	<u>Entfärbungslösung</u>
192 mM Glycin	10 % (v/v) Essigsäure	10 % (v/v) Essigsäure
25 mM Tris	0,3 mM Coomassie Brilliant Blue G250	
0,1 % (w/v) SDS		

2.8.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

2.8.2.1 Berechnung über Lambert-Beer

Zur Konzentrationsbestimmung wurden die theoretischen Extinktionskoeffizienten der Proteine bei 280 nm nach Gill und von Hippel¹⁰⁷ über die Plattform Protparam¹⁰⁸ bestimmt. Mit Hilfe des Lambert-Beer Gesetz und der Extinktion der Proteinlösungen bei 280 nm wurde die Proteinkonzentration berechnet.

Da auch Eisen-Schwefel-Cluster eine Extinktion bei 280 nm besitzen, wurde im Falle eines Eisen-Schwefel-Cluster-Proteins die Proteinlösung vorab 1:10 mit Denaturierungspuffer verdünnt. Das darin enthaltene Guanidiniumhydrochlorid entfaltet das Protein und der niedrige pH-Wert löst die Eisen-Schwefel-Interaktionen und protoniert die Cysteine.

Denaturierungspuffer

50 mM MOPS/HCl pH 1

5 M Guanidiniumhydrochlorid

2.8.2.2 Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Für die Konzentrationsbestimmung von rekonstituiertem CoFeSP wurde der Quick Start Bradford Protein Assay™ (Bio-Rad, Hercules, UK) gemäß der Herstellerangaben verwendet.

2.8.3 Bestimmung des Cofaktorgehaltes

2.8.3.1 Eisengehalt

Die Bestimmung wurde gemäß Buchanan et al. durchgeführt¹⁰⁹. Diese ermittelt die Fe^{2+} -Konzentration über die Bildung eines Phenantrolin- Fe^{2+} -Komplexes und die daraus resultierende Absorption bei 512 nm. Für CoFeSP wurden ≤ 5 nmol und für RACo ≤ 10 nmol Protein verwendet. Zu 250 μl Proteinlösung wurden 7,5 μl einer 25 %igen (v/v) HCl-Lösung gegeben und für 10 min bei 80 °C inkubiert. Nach einer Zentrifugation von 10 min bei 10000 g wurde der Überstand abgenommen und mit 750 μl ddH₂O, 50 μl einer 10 %igen (w/v) Hydroxylaminlösung und 250 μl einer 0,1 %igen (w/v) Phenantrolinlösung versetzt. Abschließend wurde die Probe für 30 min bei 20 °C inkubiert und die Absorption am UV/Vis-Spektrometer Agilent 8453 Diode Array™ (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) bei 512 nm gemessen. Zudem wurde eine Kalibriergerade im Bereich von 0 – 20 nmol Ammoniumeisen(II)-sulfat für die Konzentrationsberechnung erstellt.

2.8.3.2 Cobalamingehalt

Gereinigtes CoFeSP wurde unter Verwendung von 20 mM Kaliumcyanid auf den Cobalamingehalt untersucht¹¹⁰. Dabei entsteht ein Dicyanoderivat, dessen Konzentration über die Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{369} = 31,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und $\epsilon_{584} = 11,0 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bestimmt werden kann. Hierfür wurden 5 – 10 μl Proteinlösung in 1 ml Kaliumcyanid-Puffer gegeben und für 5 min bei 90 °C inkubiert. Nach Zentrifugation für 5 min bei 12000 g wurde die Absorption des Überstandes am UV/Vis-Spektrometer Agilent 8453 Diode Array™ (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) bei den Wellenlängen 369 nm und 584 nm gemessen.

Kaliumcyanidpuffer

50 mM CAPS/NaOH pH 10

20 mM Kaliumcyanid

2.8.4 Bestimmung der Orthophosphatkonzentration mittels Malachitgrün

Die Orthophosphatkonzentration wurde mit einer leicht veränderten Variante nach Lanzetta et al. bestimmt¹¹¹. Dabei wurden 100 µl der zu analysierenden Probe zu 800 µl Malachitgrün-Lösung gegeben und für 1 min im Dunkeln inkubiert. Abschließend wurden 100 µl Stopp-Lösung zu dem Ansatz gegeben und die Absorption bei 630 nm bestimmt. Bei Konzentrationen über 10 nmol/ml des Orthophosphats wurde die Probe vorher mit ddH₂O auf 1 – 10 nmol/ml verdünnt. Die Berechnung der Orthophosphatkonzentration erfolgte mit Hilfe einer Kalibriergeraden im Bereich von 1 – 10 nmol Orthophosphat pro ml.

Malachitgrün-Lösung

0,35 mM Malachigrün-

Oxalat

1 M HCl

8,5 mM (NH₄)₆Mo₇O₂₄

0,1‰ (v/v) Triton X-100

Stopp-Lösung

1 M Natriumcitrat

1 M HCl

2.8.5 Michael-Addition von Cysteinen mit N-[2-(l-maleimidyl)ethyl]-7-(diethylamino)coumarin-3-carboxamid

Die Konjugation von N-[2-(l-maleimidyl)ethyl]-7-(diethylamino)coumarin-3-carboxamid (MDCC) an das Cystein erfolgte nach Kunzelmann und Webb¹¹². Abweichend davon wurde das MDCC vorab in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und der Puffer mit 2 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TECP) versetzt.

2.8.6 UV/Vis Spektroskopie

Wenn nicht anders beschrieben wurden Absorptionsspektren im ultravioletten und sichtbaren Bereich (UV/Vis) mit Quarzküvetten unter anoxischen Bedingungen an einem Diodenarray-UV/Vis-Spektrometer Agilent 8453 Diode Array™ (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) gemessen.

2.9 Stopped-flow-Spektroskopie

Alle Messungen wurden an dem Model SX-20 MV™ (Applied Photophysics, Leatherhead, UK) bei 25 °C unter Verwendung eines Monochromators und eines *Photomultiplier*-Elements durchgeführt. Die Anpassung der Daten erfolgte über die Software Pro Data SX™ (Applied Photophysics, Leatherhead, UK) oder GraFit 5™ (Erithacus Software Limited, West Sussex, UK). Die UV/Vis-absorptionsspektroskopischen Messungen wurden bei der Wellenlänge 390 nm und einer Durchgangslänge von 1 cm durchgeführt. Für fluoreszenzspektroskopische

Untersuchungen wurde die Durchgangslänge von 0,2 cm genutzt. Mit Ausnahme der Phosphatdissoziation von Co(II)FeSP:RACo^{red} (2.9.6) wurden alle Messungen mindestens dreimal durchgeführt und der Mittelwert gebildet. Die Standardabweichungen sind in den jeweiligen Diagrammen als Fehlerbalken dargestellt.

2.9.1 Charakterisierung des Elektronentransfers zwischen RACo und CoFeSP

RACo wurde in ET-Puffer verdünnt und durch Zugabe von 1 mM Natriumdithionit (DT) reduziert. Die Lösung wurde in einen Konzentrator Amicon Ultra-15, PLTK Ultracel-PL Membran, 30 kDaTM gegeben und gemäß der Herstellerangaben auf 10 % des Volumens eingengt. Das Volumen wurde mit ET-Puffer auf das Ausgangsvolumen erhöht und wieder auf 10 % des Volumens konzentriert. Dieser Zyklus wurde insgesamt 6-mal wiederholt. CoFeSP wurde mit ET-Puffer in 90 % des Ausgangsvolumens verdünnt und beide Proteinlösungen miteinander gemischt. Die Endkonzentration des Komplexes Co(II)FeSP:RACo^{red} betrug 10 µM. Der Elektronentransfer wurde mittels *stopped-flow*-Spektroskopie gemessen. Dabei wurden variierende ATP-Mengen in ET-Puffer gelöst und in gleichen Volumina mit 10 µM Co(II)FeSP:RACo^{red} gemischt. Die mathematische Anpassung erfolgte gemäß der Gleichung 1.

$$A_{390}(t) = A_0 * e^{-k_{obs} * t} + c \quad (G1)$$

$A_{390}(t)$ entspricht der zeitabhängigen Absorption bei 390 nm, A_0 der Amplitude, k_{obs} der Geschwindigkeitskonstante und c der Absorption zum Zeitpunkt t_0 . Die Extinktionskoeffizienten von reduziertem und oxidiertem RACo, CoFeSP und CoFeSP ohne Cobalamin wurden gemessen, um eine theoretische Absorptionsänderung bei 390 nm (A_{theo}) von $\Delta\epsilon_{390} = 17,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für den Elektronentransfer zu berechnen. Zur Berechnung der Menge der übertragenen Elektronen wurde Gleichung 2 verwendet.

$$\text{transferierte } e^- / \text{CoFeSP} = \frac{A_0}{A_{theo}} \quad (G2)$$

A_0 entspricht der gemessenen Amplitude und A_{theo} der theoretischen Absorptionsänderung bei 390 nm.

ET-Puffer

100 mM Tris/HCl pH 7,5

150 mM NaCl

2 mM β -Mercaptoethanol

2.9.2 Elektronenübergang in Abhängigkeit von der Ammoniumchloridkonzentration

Bei variierenden NH_4Cl -Konzentrationen und einer Endkonzentration von 1 mM ATP und 3 mM MgCl_2 wurde der Elektronentransfer gemäß 2.9 gemessen. Abweichend von 2.9 erfolgte die Anpassung der Daten gemäß Gleichung 3.

$$A_{390}(t) = A_{01}e^{-k_{obs1}*t} + A_{02}e^{-k_{obs2}*t} + c \quad (\text{G3})$$

$A_{390}(t)$ entspricht der zeitabhängigen Absorption bei 390 nm, A_{01} und A_{02} den Amplituden des Elektronenübergangs, k_{obs1} und k_{obs2} den Geschwindigkeitskonstanten und c der Absorption zum Zeitpunkt t_0 . Die Anpassung der Geschwindigkeitskonstanten in Abhängigkeit zur Ammoniumchloridkonzentration erfolgte gemäß des *rapid-equilibrium*-Modells (Gleichung 4).

$$k_{obs} = \frac{k_{lim}*[lig]}{K_D + [lig]} \quad (\text{G4})$$

k_{obs} entspricht der Geschwindigkeitskonstanten, $[lig]$ ist die Ligand-Konzentration, k_{lim} der limitierenden Geschwindigkeitskonstanten und K_D der Dissoziationskonstanten. Die Anpassung der transferierten Elektronen in Abhängigkeit zur Ammoniumchloridkonzentration geschah unter Verwendung der Langmuir-Isotherme gemäß Gleichung 5.

$$e^-_{trans} = e^-_{max} * \frac{K*[lig]}{1+K*[lig]} \quad (\text{G5})$$

e^-_{trans} entspricht der Anzahl der transferierten Elektronen, $[lig]$ der Ligand-Konzentration, e^-_{max} der maximal-transferierten Elektronen und K dem Langmuir-Koeffizienten. Der Langmuir-Koeffizient ist als Assoziationskonstante definiert, der gemäß Gleichung 6 zur Berechnung der Dissoziationskonstante K_D verwendet werden kann:

$$K_D = \frac{1}{K} \quad (\text{G6})$$

Für abnehmende Werte für die Anzahl der transferierten Elektronen in Abhängigkeit von der Ligand-Konzentration wurde die Langmuir-Gleichung wie folgt modifiziert:

$$e^-_{trans} = e^-_{max} - (A * \frac{K*[lig]}{1+K*[lig]}) \quad (\text{G7})$$

Dabei entspricht e^-_{trans} der Anzahl der transferierten Elektronen, $[lig]$ der Ligand-Konzentration, e^-_{max} der maximal-transferierten Elektronen, A der Amplitude und K dem Langmuir-Koeffizienten. Der minimal-limitierende Wert e^-_{min} wurde gemäß Gleichung 8 bestimmt.

$$e^-_{min} = e^-_{max} - A \quad (G8)$$

2.9.3 Elektronenübergang in Abhängigkeit von der Kaliumchloridkonzentration

Der Elektronentransfer wurde bei verschiedenen KCl-Konzentrationen und einer Endkonzentration von 1 mM ATP und 3 mM $MgCl_2$ gemessen. Die Anpassung der Geschwindigkeitskonstanten in Abhängigkeit zur Kaliumkonzentration erfolgte gemäß der Hill-Gleichung (Gleichung 9).

$$k_{obs} = \frac{[KCl]^n}{K_A^n + [KCl]^n} \quad (G9)$$

k_{obs} entspricht der Geschwindigkeitskonstanten, n dem Hill-Koeffizienten und K_A der KCl-Konzentration der halben limitierenden Ratekonstante. Für die Anpassung der transferierten Elektronen in Abhängigkeit zur Kaliumkonzentration wurde die Langmuir-Isotherme gemäß der Gleichung 5 genutzt.

2.9.4 Bestimmung von K_D und k_{lim} in Abhängigkeit der ATP-Konzentration

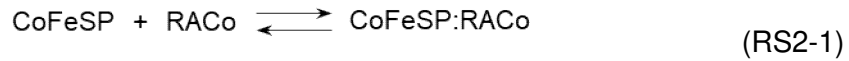
Die Zusammensetzung des ET-Puffers wurde mit 500 mM KCl, 150 mM NH_4Cl oder 500 mM KCl + 150 mM NH_4Cl modifiziert. Die Endkonzentration von $MgCl_2$ lag bei jeder Messung 5 mM über der verwendeten ATP-Endkonzentration. Die Anpassung der Geschwindigkeitskonstanten in Abhängigkeit zur ATP-Konzentration erfolgte gemäß des *rapid-equilibrium*-Modells (Gleichung 4).

2.9.5 Charakterisierung der Interaktionen von $RACo^{ox}$ und $Co(II)FeSP$ mittels Tryptophanfluoreszenz

Die Assoziationsstudien von $RACo$ und $CoFeSP$ wurden über die Änderung der Tryptophanfluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm und einem Emissionsfilter mit dem *cut-off* 320 nm verfolgt. Dabei wurden 0,5 μM $CoFeSP$ und variierende Konzentrationen von $RACo$ eingesetzt. Zur mathematischen Annäherung wurde Gleichung 10 verwendet.

$$rF(t) = A0 * e^{-k_{obs}*t} + c \quad (G10)$$

$rF(t)$ entspricht der zeitabhängigen relativen Fluoreszenz, $A0$ der Amplitude, k_{obs} der Geschwindigkeitskonstante und c der relativen Fluoreszenz zum Zeitpunkt t_0 . Da die gemessenen Daten durch mono-exponentielle Regression angepasst werden konnten, wurden sie als Einzelbindungsmechanismus gemäß Reaktionsschema 2-1 interpretiert:



Bei den gemessenen Reaktionen wurde mindesten eine 10-fach höhere Konzentration von RACo eingesetzt, wodurch die Daten gemäß einer Reaktion pseudo-erster Ordnung interpretiert werden konnten. Die Bindungskonstanten wurden daher durch lineare Regression unter Verwendung der Gleichung 11 bestimmt.

$$k_{obs} = k_{off} + k_{on} * [\text{RACo}] \quad (\text{G11})$$

Dabei entspricht k_{obs} der gemessenen Geschwindigkeitskonstanten, k_{off} der Geschwindigkeitskonstanten der Dissoziation und k_{on} der Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation.

2.9.6 Charakterisierung der Phosphatdissoziation von Co(II)FeSP:RACo^{red}

Für die Detektion der Phosphatdissoziation nach der Hydrolyse von ATP wurde die konjugierte Variante des *E. coli*-eigenen Phosphatbindungsproteins MDCC-PBP nach Brune et al. verwendet¹¹³. Die Reaktionen wurden fluoreszenzspektroskopisch mit Hilfe der *stopped-flow*-Spektroskopie gemessen. Bei einer Anregungswellenlänge von 425 nm wurde ein Emissionsfilter mit dem *cut-off* 455 nm genutzt. Verwendet wurden die Endkonzentrationen von 0,5 μM Co(II)FeSP:RACo^{red} und 10 μM MDCC-PBP. Um Reste von Phosphat im verwendeten ATP vor der Messung weitestgehend zu entfernen, wurde die ATP mittels Anionenaustauschchromatographie vorab gereinigt. Die mathematische Anpassung geschah mit Hilfe der Gleichung 12.

$$rF(t) = A0 * e^{-k_{obs} * t} + k_{ss} * t + c \quad (\text{G12})$$

Dabei entspricht $rF(t)$ der zeitabhängigen relativen Fluoreszenz, $A0$ der Amplitude, k_{obs} der Geschwindigkeitskonstante für die Phosphatdissoziation während des initialen Elektronenübergangs, k_{ss} der Geschwindigkeitskonstante für die Phosphatdissoziation im darauffolgenden Gleichgewicht und c der relativen Fluoreszenz zum Zeitpunkt t_0 .

2.9.6.1 Anionenaustauschchromatographie zur ATP-Reinigung

Die Abtrennung von Phosphaten erfolgte mit einer Leersäule der Firma Agarose Bead Technologies (Miami, USA) mit 3 ml des Materials Q Sepharose Fast Flow™ (GE Healthcare, Illinois, USA). Dazu wurde ATP in AP-Laufpuffer auf eine Konzentration von 0,5 µM gelöst und nach folgendem Verlauf gereinigt:

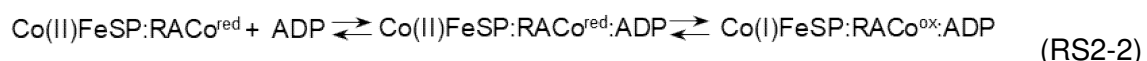
Äquilibrieren:	5 Säulenvolumen AP-Laufpuffer
Laden der ATP-Lösung	
Waschen:	10 Säulenvolumen zu 95 % AP-Laufpuffer und 5 % AP-Elutionspuffer
Elution:	5 Säulenvolumen AP-Elutionspuffer
Flussgeschwindigkeit:	1 ml/min

ATP-haltiges Eluat wurde durch Überwachung der Leitfähigkeit gesammelt, um eine Konzentration von 500 mM KCl zu erhalten.

<u>AP-Laufpuffer</u>	<u>AP-Elutionspuffer</u>
20 µM Tris/HCl, pH 7.5	20 µM Tris/HCl, pH 7.5 1 M KCl

2.10 Titration des ADP induzierten Elektronentransfers zwischen RACo und CoFeSP

5 µM Co(II)FeSP:RACo^{red} wurden, wie im Abschnitt 2.9.1 beschrieben, in ET-Puffer mit 500 mM KCl präpariert. Anschließend wurde ADP und MgCl₂ zu der Lösung gegeben und die Konzentrationen schrittweise erhöht. Die MgCl₂-Konzentration lag dabei 1 mM über der ADP-Konzentration. Die Änderung in der Absorption bei 390 nm wurde am Diodenarray-UV/Vis-Spektrometer Agilent 8453 Diode Array™ (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) verfolgt. Die Anpassung der transferierten Elektronen in Abhängigkeit zur ADP-Konzentration erfolgte unter der Annahme einer Gleichgewichtsreaktion gemäß des Reaktionsschemas 2-2:



Für die mathematische Regression wurde die Langmuir-Isotherme (Gleichung 5).

2.11 Präparation von Co(I)FeSP und Interaktionsanalyse von Co(I)FeSP und RACo^{ox}

CoFeSP wurde auf die gewählte Konzentration in ET-Puffer mit 500 mM KCl verdünnt und durch Zugabe von 1 mM Titan(III)citrat reduziert. Die Lösung wurde mit Hilfe eines Konzentrators Amicon Ultra-15, PLTK Ultracel-PL Membran, 10 kDa™ auf 10 % des Volumens eingeeengt und mit ERT-Puffer auf das Ausgangsvolumen gebracht. Dieser Zyklus wurde insgesamt 6-mal wiederholt.

Zur Charakterisierung der Interaktionen wurden zu Co(I)FeSP (Endkonzentration 2,5 µM) RACo^{ox} (Endkonzentration ≥ 25 µM) gegeben und die Absorptionsänderung bei 390 nm am Diodenarray-UV/Vis-Spektrometer Agilent 8453 Diode Array™ (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) verfolgt. Abweichend von 2.8.6 wurden Glasküvetten (Spektralbereich: 320 – 2500 nm) verwendet. Durch die Verwendung von Glasküvetten wurde die Intensität von energiereichen UV-Licht mit einer Wellenlänge von unter 320 nm verringert, um eine mögliche Photoreduktion von Co(II)FeSP zu vermeiden. Die Geschwindigkeitskonstanten wurden mit Gleichung 1 bestimmt und als Einzelbindungsmechanismus gemäß Reaktionsschema 2-1 interpretiert. Die Bindungskonstanten wurden anschließend durch lineare Regression unter Verwendung der Gleichung 11 ermittelt. Mit den daraus berechneten Geschwindigkeitskonstanten konnte die Dissoziationskonstante (K_D) bestimmt werden (Gleichung 13).

$$K_D = \frac{k_{off}}{k_{on}} \quad (G13)$$

K_D entspricht der Dissoziationskonstanten, k_{off} die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation und k_{on} der Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation.

ERT-Puffer

100 mM Tris/HCl pH 7,5

150 mM NaCl

500 mM KCl

2 mM Dithiothreitol

2.12 Charakterisierung der ATP-Hydrolyse während des Elektronentransfers von Co(II)FeSP:RACo^{red}

Co(II)FeSP:RACo^{red} wurde in einer Endkonzentration von 20 µM gemäß Abschnitt 2.9.1 präpariert. Um den Elektronenübergang zu starten wurden 50 µl der Lösung mit 50 µl einer ATP-Lösung gemischt und die Reaktion durch Zugabe von 6 µl 1 M Trichloressigsäure gestoppt. Die Lösung wurde bei 13000 g für 10 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen

und mit 6 µl 1 M NaOH versetzt. Die ADP-Konzentration wurde mittels HPLC bestimmt. Die gemessenen ADP-Konzentrationen wurden anschließend an Gleichung 14 angepasst.

$$[ADP](t) = A_{ADP} * e^{-k_{obs} * t} + k_{ss} * t + c \quad (G14)$$

Dabei entspricht $[ADP](t)$ der zeitabhängigen ADP-Konzentration, A_{ADP} der Amplitude für den Elektronenübergang, k_{obs} der Geschwindigkeitskonstante für den initialen Elektronenübergang, k_{ss} der Geschwindigkeitskonstanten für das darauffolgende Gleichgewicht und c der ADP-Konzentration zum Zeitpunkt t_0 .

2.12.1 ADP-Quantifizierung mittels HPLC

Für die Trennung von ATP und ADP wurde eine Kromasil™ 100-5-C18 3.9 x 250 mm HPLC-Säule verwendet. Es wurde ein kontinuierlicher Gradient bei 30 °C gemäß folgender Mischungsverhältnisse genutzt:

Zeit in min	HPLC-Laufmittel-A in %	HPLC-Laufmittel-B in %
0	99,6	0,4
0,9	99,6	0,4
3,5	99,3	0,7
6,1	99	1
7,5	50	50
8,5	50	50
10	99,6	0,4
16	99,6	0,4

HPLC-Laufmittel-A

10 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 ,
pH 5.8

HPLC-Laufmittel-B

75 % Acetonitril
25 % 10 mM CH_3COOK ,
pH 4.8

3 Ergebnisse

3.1 Rekombinante Genexpression und Proteinreinigung

Für die rekombinante Genexpression der Gene *orf7* (codierend für RACo), *acsC* (codierend für CfsA) und *acsD* (codierend für CfsB) wurde der *E. coli*-Stamm Rosetta (DE3) verwendet. Die jeweiligen Gensequenzen wurden mit dem *E. coli*-Codon-Usage-Analyzer 2.1™ von Morris Maduro¹¹⁴ auf Codons mit kritischer Codonverwendung untersucht. Durch die Verwendung des *E. coli*-Stammes Rosetta (DE3) wurde der prozentuale Anteil von Codons mit kritischer Codonverwendung deutlich reduziert (Tab. 7-1, Anhang).

Etablierte Genexpressions- und Reinigungsstrategien ergaben für RACo 47 – 70 % des zu erwartenden Eisengehaltes und für CoFeSP nur 50 – 80 % gebundenes Cobalamin und 55 – 90 % des Eisengehaltes. Des Weiteren neigte die rekombinante Genexpression von *acsC* zur Bildung von *Inclusion Bodies*^{100,115}. Die nicht korrekte Ausbildung eines Eisen-Schwefel-Clusters kann die Bildung von *Inclusion Bodies* begünstigen¹¹⁶.

Um die korrekte Bildung der Eisen-Schwefel-Cluster im rekombinanten Proteinen RACo und CoFeSP zu unterstützen, wurden die Rosetta (DE3)-Zellen zusätzlich zum Expressionsvektor mit dem Plasmid pRKISC nach Nakamura et al. cotransformiert¹¹⁷.

Das Plasmid pRKISC enthält Gene von Reifungsproteinen für die Eisen-Schwefel-Cluster-Assemblierung und kann bei rekombinanter Genexpression den Eisen-Schwefel-Cluster-Gehalt und die Expression rekombinanter Eisen-Schwefel-Cluster-Proteine steigern. Zusätzlich wurden alle Expressionskulturen vor der Induktion der rekombinanten Proteinbiosynthese durch IPTG für 20 min auf Eis inkubiert. Durch den so erzeugten *Cold Shock* wird die Expression mehrerer *E. Coli*-eigenen Gene, welche für die rekombinante Genexpression nicht von großer Bedeutung sind, gehemmt¹¹⁸. Hinzu kommt eine erhöhte Expression von Genen, welche Chaperone codieren¹¹⁹.

3.1.1 RACo

Für die rekombinante Genexpression wurden transformierte Rosetta (DE3)-Zellen in 8 l TB-Medium kultiviert. Die geerntete Zellfeuchtmasse lag bei 6,2 g pro l Kultur. Die Reinigung wurde gemäß Abschnitt 2.7 durchgeführt und durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert (Abb. 3-1). Die Ausbeute lag bei 69 ± 6 mg gereinigtes Protein je l Expressionskultur mit einem Eisengehalt von $1,96 \pm 0,06$ mol je mol RACo (98 ± 3 % des zu erwartenden Eisengehaltes).

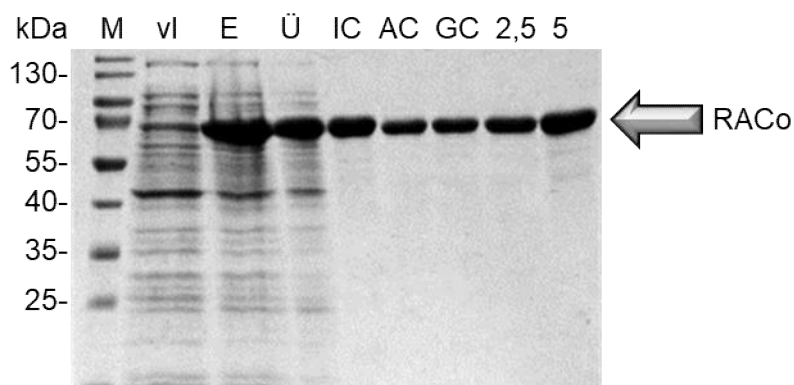


Abbildung 3-1. 12 %iges SDS-Gel der rekombinanten Genexpression und Reinigung von RACo.

Aufgetragen wurden neben dem Größenstandard (M) Proben vor der Induktion durch IPTG (vl), nach der Ernte (E), des löslichen Überstand nach Zellaufschluss (Ü), nach der IMAC, nach der Anionenaustauschchromatographie (AC), nach der Größenausschlusschromatographie (GC) und 2,5 µg und 5 µg des gereinigten Proteins.

3.1.2 CoFeSP

Wie im Abschnitt 2.5.8 beschrieben, wurde das Gen *acsD* in das Expressionsplasmid pET28a-His/TEV und das Gen *acsC* in das Expressionsplasmid pET15b kloniert. Für die Bildung des Heterodimers wurden *acsC* in 6 l TB-Medium und *acsD* in 2 l TB-Medium exprimiert, die Zellen geerntet und in einem gemeinsamen Ansatz aufgeschlossen. Das Zelllysat wurde zentrifugiert und der Überstand für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die Bildung des Heterodimers zu unterstützen. Der Überschuss der Expressionskultur von *acsC* ermöglichte eine annähernde Sättigung des Fusionsproteins der kleinen Untereinheit (His₆-TEV-CfsA) mit der großen Untereinheit (CfsB) von CoFeSP. Abweichend von Abschnitt 2.7 wurde während der Anionenaustauschchromatographie das am Säulenmaterial immobilisierte Protein mit mindestens 20 Säulenvolumen Anionenlaufpuffer gewaschen, um das Imidazol des IMAC-Elutionspuffers vollständig zu entfernen. Verbleibendes Imidazol hätte sonst bei der anschließenden Rekonstitution das Aquocobalamin koordinieren können¹²⁰.

Die Rekonstitution mit Aquocobalamin geschah in einem molaren Verhältnis von 1,2 M Aquocobalamin zu 1 M CoFeSP. Nach Zugabe des Cofaktors wurde der Ansatz über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Abtrennung des überschüssigen Cobalamins und als finaler Reinigungsschritt wurde eine Größenausschlusschromatographie gemäß Abschnitt 2.7 durchgeführt (Abb. 3-2). Die Ausbeute lag bei 16 ± 3 mg gereinigtes Protein je l Expressionskultur mit einem Eisengehalt von $3,96 \pm 0,05$ mol je mol CoFeSP ($99 \pm 1,3$ % des zu erwartenden Eisengehaltes). Die Bestimmung des Cobalamingehaltes erfolgte nach Menon et al.¹¹⁰ und ergab $0,98 \pm 0,03$ mol je mol CoFeSP (98 ± 3 % des zu erwartenden Cobalamingehaltes).

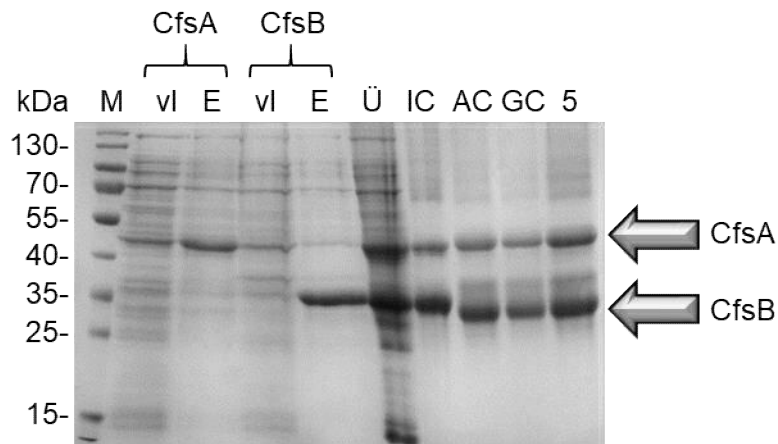


Abbildung 3-2. 12 %iges SDS-Gel der Rekombinante Genexpression und Reinigung von CoFeSP.

Aufgetragen wurden der Größenstandard (M), Proben vor der Induktion durch IPTG (vI), nach der Ernte (E), des löslichen Überstand nach Zellaufschluss (Ü), nach der IMAC, nach der Anionenaustauschchromatographie (AC), nach der Größenausschlusschromatographie (GC) und 5 µg des gereinigten Proteins.

3.1.3 MDCC-PBP

Für die rekombinante Expression wurde das Plasmid pET22b_PstS_1 (Plasmid #78198) der Firma Addgene (Watertown, USA) genutzt und die Kultivierung und Reinigung mittels Anionenaustauschchromatographie gemäß Solscheid et al. angewendet¹²¹.

Die Analyse unter Verwendung des Malachitgrün-Assays¹¹¹ ergab jedoch, dass das gereinigte Protein bereits zu $98 \pm 2\%$ Orthophosphat (P_i) gebunden hatte, was für spätere P_i -Detektionen ungünstig war. Da weder durch die in den Publikationen beschriebene Behandlung mit 7-Methylguanosin und der Purin-Nucleosid-Phosphorylase noch eine längere Waschphase während der Anionenaustauschchromatographie eine signifikante Verbesserung erreicht wurde, erfolgte ein alternativer Ansatz. Zunächst wurde versucht das Protein mit variierenden Konzentrationen von 1 – 5 M Guanidiniumhydrochlorid partiell zu entfalten¹²². Die Proteinlösungen wurden in einen Konzentrator Vivaspin 500, 10.000 MWCO PES™ gegeben und die Orthophosphatkonzentration des Durchflusses mit Hilfe des Malachitgrün-Assays bestimmt. Durch den verwendeten Konzentrator wird das Protein im Überstand gehalten, wohingegen sich dissoziiertes P_i bei einer Entfaltung des Proteins im Durchfluss nachweisen lassen müsste. Das Ergebnis zeigte, dass 2 M Guanidiniumhydrochlorid das Protein stark genug entfaltet, um das gebundene P_i abzutrennen (Abb. 3-3).

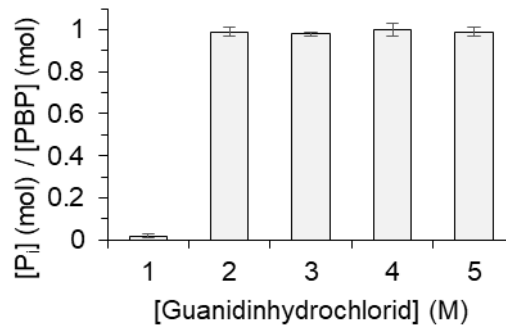


Abbildung 3-3. Analyse der Orthophosphatkonzentration des Durchflusses durch den Konzentrator Vivaspin 500, 10.000 MWCO PES™. Die Konzentration des Orthophosphats wurde mit Hilfe des Malachitgrün-Assays bestimmt und in Verhältnis zur eingesetzten Proteinkonzentration gesetzt.

Weiterführend wurde die DNA-Sequenz codierend für das Phosphatbindungsprotein (PBP) in den Vektor pET-28a-HIS/TEV kloniert. Das ermöglichte die Immobilisierung des Proteins am Säulenmaterial und das Entfernen des Phosphats, durch partielles Entfalten und Rückfalten des Proteins, im ersten Reinigungsschritt.

Dafür wurde das Plasmid in BL21 (DE3)-Zellen transformiert und in 4 l TB-Medium kultiviert und geerntet. Die Zellen wurden aufgeschlossen und das Protein mittels IMAC zunächst immobilisiert. Abweichend vom Abschnitt 2.7.2 wurde das Protein nach dem Waschschrift nicht eluiert, sondern durch einen Laufpufferwechsel, welcher zusätzlich 2 M Guanidiniumhydrochlorid enthielt, partiell entfaltet, um das gebundene P_i zu entfernen. Nach 5 Säulenvolumen wurde zu dem anfangs verwendeten Laufpuffer ohne Guanidiniumhydrochlorid gewechselt. Durch das Entfernen des Guanidiniumhydrochlorids kommt es zu einer Rückfaltung des Proteins noch während es am Säulenmaterial immobilisiert ist. Diese Methode konnte auch schon für andere His₆-tag-Fusionsproteine beschrieben werden¹²³. Anschließend wurde das Protein eluiert und einer Größenausschlusschromatographie unterzogen, um letzte Verunreinigungen und das Imidazol abzutrennen. Die oxidierende Wirkung des Imidazol hätte sich anderenfalls störend auf die nachfolgende Biokonjugation auswirken können.

Nach der Konjugation des MDCC wurde überschüssiges MDCC mit Hilfe der 35 ml Sephadex G-25™ (GE Healthcare) abgetrennt. Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese zeigte ein weitgehend reines Protein (Abb. 3-4).

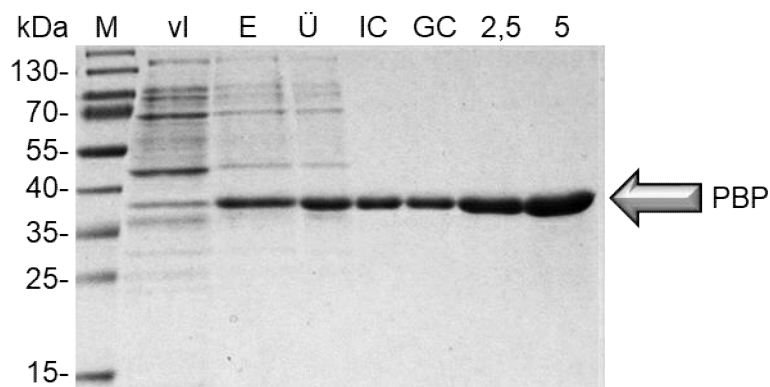


Abbildung 3-4. 12 %iges SDS-Gel der rekombinante Genexpression und Reinigung von PBP.

Aufgetragen wurden neben dem Größenstandard (M) Proben vor der Induktion durch IPTG (vI), nach der Ernte (E), des löslichen Überstand nach Zellaufschluss (Ü), nach der IMAC, nach der Anionenaustauschchromatographie (AC), nach der Größenausschlusschromatographie (GC) und 2,5 µg und 5 µg des gereinigten Proteins.

3.2 Optimierung der Reaktionsbedingungen der Elektronentransferreaktion von reduziertem RACo auf Co(II)FeSP

Der ATP-abhängige Elektronentransfer vom reduzierten [2Fe2S]-Cluster von RACo auf Co(II)FeSP konnte durch Hennig et al. nachgewiesen werden⁷⁷. Dabei wurde das [2Fe2S]-Cluster von RACo mit Dithiothreitol (DTT) reduziert und der Elektronentransfer auf das Co²⁺ des Cobalamins durch Zugabe von ATP induziert. Der Übergang von Co(II)FeSP zu Co(I)FeSP kann dabei über die Absorption bei 390 nm und 475 nm verfolgt werden^{77,124,125}. Für eine tiefer gehende kinetische Charakterisierung und die Bestimmung des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes mussten die Reaktionsbedingungen jedoch zunächst optimiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass für den ATP-abhängigen Elektronentransfer Mg²⁺ und K⁺ benötigt werden⁷⁷. Ob es für beide Ionen ein Konzentrationsoptimum gibt und ob noch andere Ionen einen Einfluss haben, war jedoch nicht bekannt. Ungünstig für eine kinetische Analyse war auch die Verwendung von DTT als Reduktionsmittel. DTT besitzt pH-Wert-abhängig ein Redox-Potential von -332 mV bei pH 7 und -366 mV bei pH 8,¹²⁶. Das Redox-Potential des [2Fe2S]-Clusters von RACo erhöht sich von -370 mV auf -337 mV im Komplex mit CoFeSP. Daraus folgt, dass sich das [2Fe2S]-Cluster von RACo nur im Proteinkomplex CoFeSP:RACo bei nicht-physiologischen pH-Werten ≥ 8 mit DTT reduzieren lässt. Hinzu kommt, dass DTT über eine Radikalform das Co²⁺ des Cobalamins koordinieren kann¹²⁷, was die Kinetik des Elektronentransfers zwischen RACo und CoFeSP beeinflussen könnte. Daher wurde versucht Bedingungen zu finden, welche die kinetischen Untersuchungen bei einem physiologischen pH-Wert ohne Verwendung von DTT ermöglichen.

Natriumdithionit (DT) besitzt je nach Reaktionsbedingung mit einem Redox-Potential von -430 mV³⁵ bis -660 mV¹²⁸ die Fähigkeit, das [2Fe2S]-Cluster von RACo bei einem physiologischen pH-Wert zu reduzieren. Jedoch kann auch DT über die Bildung eines Radikals das Co²⁺ des Cobalamins koordinieren. Um dies weitgehend zu verhindern, wurden 5 µM RACo mit 1 mM DT reduziert und die DT-Konzentration durch mehrere Verdünnungs-/Konzentrationszyklen auf höchstens 1 nM verringert. Dabei wurde versucht, die Oxidation des [2Fe2S]-Cluster durch 5 mM β-Mercaptoethanol verhindert. Das Redox-Potential von β-Mercaptoethanol liegt je nach Bedingung zwischen -200 mV bis -250 mV^{129,130} und kann das [2Fe2S]-Cluster von RACo somit nicht reduzieren. Das gemessene Absorptionsspektrum wies nach den Verdünnungs-/Konzentrationszyklen auf eine vollständige Reduktion des [2Fe2S]-Clusters hin (Abb. 3-5A). Anschließend wurden das reduzierte RACo und Co(II)FeSP äquimolar gemischt und der Elektronentransfer durch Zugabe von 2 mM MgATP²⁻ initiiert. Die Reduktion von Co(II)FeSP zu Co(I)FeSP wurde UV/Vis-spektroskopisch verfolgt. Das so gemessene UV/Vis-Differenzspektrum wurde anschließend mit dem UV/Vis-Differenzspektrum des Elektronentransfers nach der etablierten Methode nach Hennig et al.⁷⁷ und einem berechneten UV/Vis-Differenzspektrum des Elektronentransfers verglichen. Das berechnete UV/Vis-Differenzspektrum wurde aus den spektralen Änderungen von reduzierten zu oxidierten RACo und dem Übergang Co(II)FeSP zu Co(I)FeSP ermittelt. Für einen besseren Vergleich wurden die Spektren auf einen einheitlichen Wert bei 390 nm normiert (Abb. 3-5 B).

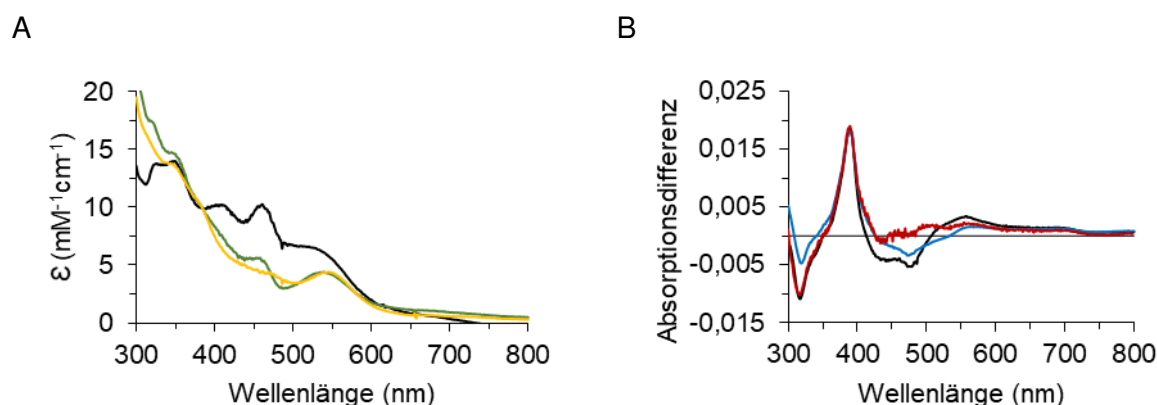


Abbildung 3-5. Reduktion von RACo und Differenzspektren des Elektronentransfers von RACo^{red} auf Co(II)FeSP. In A sind die Absorptionsspektren von oxidiertem RACo (schwarz), mit DTT reduziertem RACo (grün) und durch DT reduzierten und mit β-Mercaptoethanol reduziert gehaltenem RACo (gelb) abgebildet. B zeigt das theoretische (berechnete) Differenzspektrum (schwarz) und die gemessenen Differenzspektren des Elektronenübergangs nach der von Hennig et al.⁷⁷ etablierten Methode (blau) und des neu entwickelten Assays in Abwesenheit von DTT (rot). Die Berechnung des theoretischen Differenzspektrums ist im Text beschrieben.

In Abbildung 3-5 ist zu erkennen, dass die Vermeidung von DTT während des Elektronentransfers zu einem UV/Vis-Differenzspektrum führt, welches in den Bereichen von 300 – 360 nm und 520 – 570 nm größere Übereinstimmungen mit dem berechneten UV/Vis-Differenzspektrum zeigt. Jedoch sind die Abweichungen von 450 – 550 nm größer als in der etablierten Methode nach Hennig et al.⁷⁷.

3.3 Auswirkung verschiedener Kationen auf den ATP-gekoppelten Elektronentransfer

Der MgATP^{2-} -Komplex ist das meistgenutzte Substrat für ATP-abhängige Enzyme. Für RACo konnte sowohl für den Elektronentransfer als auch für die basale ATP-Hydrolyse eine Abhängigkeit von Mg^{2+} und K^+ nachgewiesen werden⁷⁷. Da spezifische Aktivitäten für strukturähnliche Proteine auch in Anwesenheit anderer Ionen nachgewiesen werden konnten^{94,131,132}, wurde die Aktivität von RACo in Abhängigkeit verschiedener Ionen näher untersucht. Dafür wurde die Änderung der Absorption bei 390 nm mittels *stopped-flow*-Spektroskopie gemessen. Die jeweiligen Ionen besaßen eine Endkonzentration von 2 mM. Des Weiteren wurden mit einer Endkonzentration von 1 mM ATP und 5 μM des Komplexes aus reduziertem RACo und Co(II)FeSP die Bedingung für eine Reaktion pseudo-erster Ordnung erfüllt. Mg^{2+} , K^+ und NH_4^+ zeigten die Katalyse des ATP-abhängigen Elektronentransfers zwischen RACo^{red} und Co(II)FeSP . In Anwesenheit von Mn^{2+} , Na^+ , Rb^+ , Ni^{2+} , Fe^{2+} und Ca^{2+} konnte kein Elektronentransfer beobachtet werden. Alle Salze wurden in den jeweiligen Chlorid-Verbindungen verwendet, um einen Einfluss des Gegenions auszuschließen.

Bei der gemessenen Reaktion handelt es sich um einen *single turnover*, in welchem jeweils nur 1 mol reduziertes RACo 1 mol Co(II)FeSP reduzieren kann. Dementsprechend wurden die kinetischen Parameter gemäß Gleichung 1 durch exponentielle Regression näher bestimmt. Abbildung 3-6 zeigt, dass die Geschwindigkeitskonstante des Elektronenübergangs und die Anzahl der übertragenen Elektronen von der Art des verwendeten Ions beeinflusst werden.

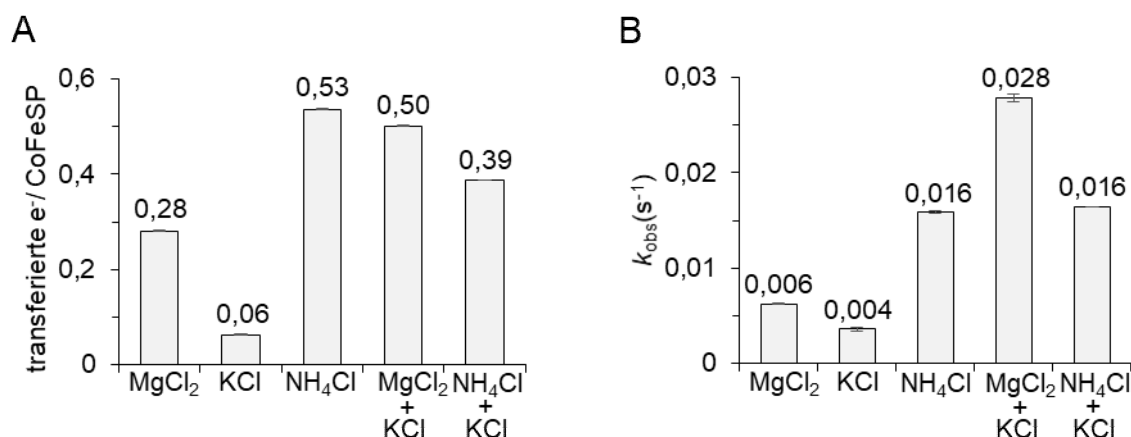


Abbildung 3-6. Einfluss von verschiedenen Ionen auf den Elektronentransfer von Co(II)FeSP:RACo^{red}. In Abbildung A sind die übertragenen Elektronen/CoFeSP und in Abbildung B die Geschwindigkeitskonstanten der jeweiligen Bedingungen angegeben. Die Konzentration der Salze betrug 2 mM bei 1 mM ATP.

Der höchste k_{obs} von $1,61 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ und die meisten übertragenen Elektronen/CoFeSP konnten bei 2 mM NH₄Cl gemessen werden. Die Verwendung von 2 mM KCl ergab sowohl den niedrigsten k_{obs} von $4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ als auch mit 0,06 die wenigsten übertragenen Elektronen/CoFeSP. Die ermittelte Geschwindigkeitskonstante bei 2 mM MgCl₂ ($6 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$) war vergleichbar zu 2 mM KCl ($4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$), aber war mit 0,28 übertragenen Elektronen/CoFeSP etwa fünfmal effizienter.

Weiterführend wurde untersucht, wie MgCl₂, KCl und NH₄Cl in Kombination den Elektronenübergang beeinflussen. Dabei konnte bei der Verwendung von MgCl₂ und KCl sowohl eine Erhöhung des k_{obs} auf $2,84 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ als auch der übertragenen Elektronen/CoFeSP auf 0,5 beobachtet werden. Die Kombination von KCl und NH₄Cl ergab mit $1,61 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ einen vergleichbaren k_{obs} zu NH₄Cl von $1,64 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$. Der Wert der übertragenen Elektronen/CoFeSP lag zwischen den Werten der jeweiligen Einzelmessungen. Die kinetischen Parameter der Kombination von MgCl₂ und NH₄Cl konnten mathematisch nur durch doppelt-exponentielle Regression gemäß der Gleichung 3 bestimmt werden (Abb. 3-7). Die Geschwindigkeitskonstante k_{obs1} war mit $0,287 \text{ s}^{-1}$ höher als alle zuvor bestimmten Geschwindigkeitskonstanten und k_{obs2} lag mit $0,046 \text{ s}^{-1}$ leicht höher als NH₄Cl. Die Summe der transferierten Elektronen war mit 0,66 ebenfalls höher als unter den zuvor gemessenen Bedingungen. Dieser Wert wich, im Gegensatz zu den Werten, welche durch mono-exponentielle Regression bestimmt wurden, stark von den gemessenen Absorptionsänderungen ab. Aus der Differenz zwischen dem Endwert ($40,56 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) und dem Anfangswert ($30,61 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) der Absorption ergaben sich nur 0,57 transferierte Elektronen pro CoFeSP. Diese Abweichungen resultieren wahrscheinlich aus Ungenauigkeiten in der mathematischen Annäherung.

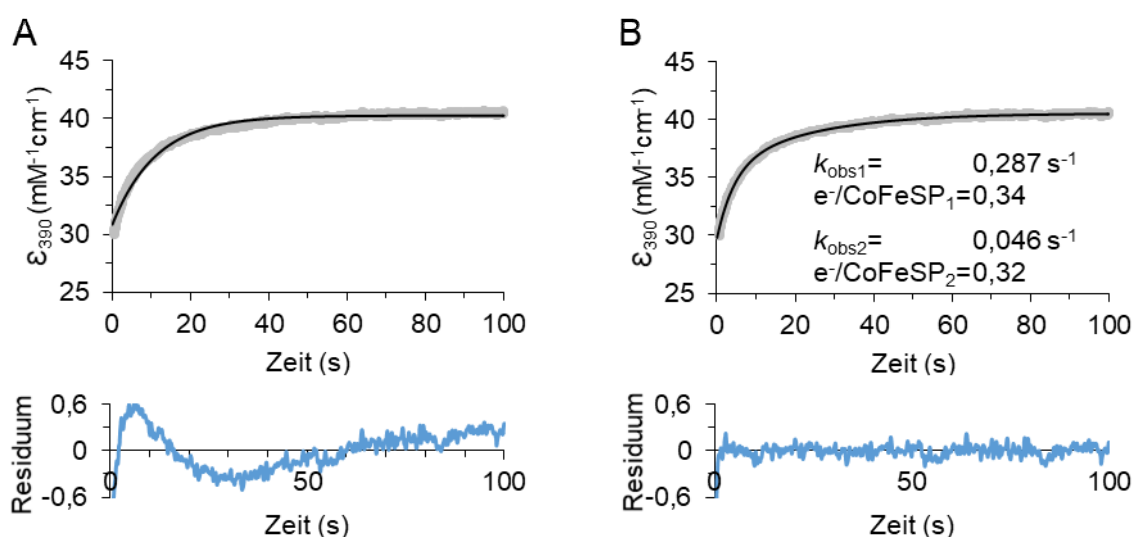


Abbildung 3-7. Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten und der übertragenen Elektronen pro CoFeSP in Anwesenheit von 2 mM MgCl und 2 mM NH₄Cl. (A) Mathematische Annäherung der Absorptionsänderung bei 390 nm durch mono-exponentielle Regression. (B) Mathematische Annäherung der Absorptionsänderung bei 390 nm durch doppel-exponentielle Regression. Das Residuum (Abweichung von der Regression) ist unter der jeweiligen mathematischen Annäherung in blau gezeigt.

Da die Kombinationen von MgCl₂ mit NH₄Cl oder KCl die Geschwindigkeitskonstanten und die Anzahl der transferierten Elektronen deutlich steigerten, wurde der Einfluss variierender Ionenkonzentrationen auf den Elektronentransfer gemessen. Dafür wurde zunächst der Elektronentransfer bei verschiedenen NH₄Cl-Konzentrationen und konstanter MgCl₂-Konzentration bestimmt.

Es war zu erkennen, dass beide Geschwindigkeitskonstanten durch Erhöhung der NH₄Cl-Konzentration zunehmen (Abb. 3-8). Hieraus ergaben sich zwei limitierende Geschwindigkeitskonstanten, welche sich in etwa um den Faktor 15 unterschieden. Die bestimmten K_D -Werte lagen mit $K_{D1} = 31,75 \text{ mM}$ und $K_{D2} = 9 \text{ mM}$ in einem ähnlichen Bereich.

Für die Anzahl der transferierten Elektronen konnten bei 10 mM NH₄Cl für beide Exponentialfunktionen noch ähnliche Werte bestimmt werden. Mit steigender NH₄Cl-Konzentration zeigte sich jedoch eine Zunahme der transferierten Elektronen der Exponentialfunktion mit höheren Geschwindigkeitskonstanten, wohingegen die Anzahl der transferierten Elektronen der Exponentialfunktion mit niedrigeren Geschwindigkeitskonstanten abnahm. Die vergleichbaren Langmuir-Koeffizienten von $K_1 = 0,09 \text{ mM}^{-1}$ und $K_2 = 0,1 \text{ mM}^{-1}$ lassen auf einen direkten Einfluss beider Reaktionen aufeinander schließen. Die Summe der übertragenen Elektronen blieb weitgehend konstant.

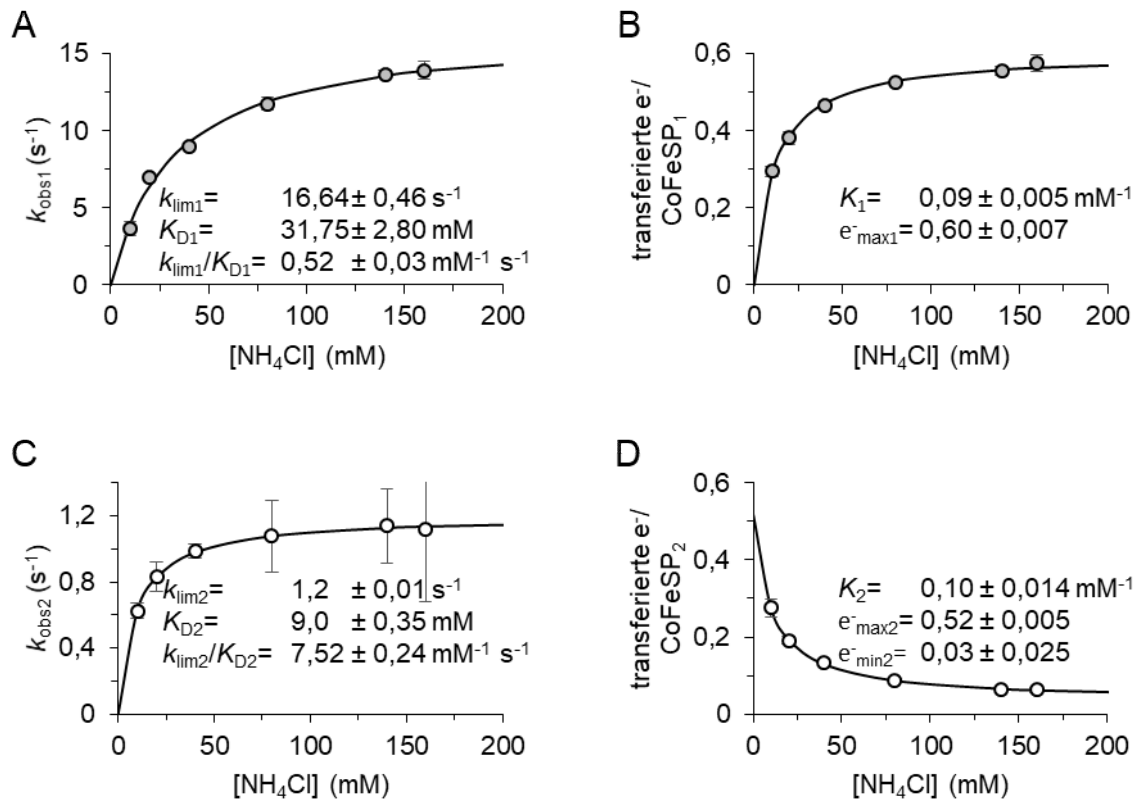


Abbildung 3-8. Einfluss der NH_4Cl -Konzentration auf die Geschwindigkeitskonstanten (A + C) und transferierten Elektronen je CoFeSP (B + D). Die mathematische Anpassung der Daten erfolgte unter der Annahme eines *rapid equilibriums* (A + C) und der Verwendung der Langmuir-Isothermen-Gleichung (B + D).

Die gleiche Methode wurde genutzt, um den Einfluss der KCl-Konzentration zu bestimmen. In Abbildung 3-9 ist zu erkennen, dass die Erhöhung der KCl-Konzentration sowohl die Geschwindigkeitskonstante als auch die Anzahl der transferierten Elektronen erhöht. Die Anpassung der Geschwindigkeitskonstanten unter Verwendung der Hill-Gleichung mit einem Hill-Koeffizienten von 1,7 könnte auf zwei kooperative Bindungsstellen hinweisen. Im Gegensatz dazu zeigt die mathematische Anpassung der transferierten Elektronen an die Langmuir-Isotherme keinen Einfluss einer zweiten Bindungsstelle. Die Anzahl der transferierten Elektronen erreicht schon bei geringeren KCl-Konzentrationen von ca. 10 mM annähernd ihren maximalen Wert. Mit 0,51 liegt der maximale Wert der übertragenen Elektronen in etwa im selben Bereich wie in den vorgehenden Messungen. Da beide Werte bei 500 mM KCl annähernd gesättigt waren, wurde entschieden, die Elektronentransferreaktion unter diesen Bedingungen weiter zu untersuchen.

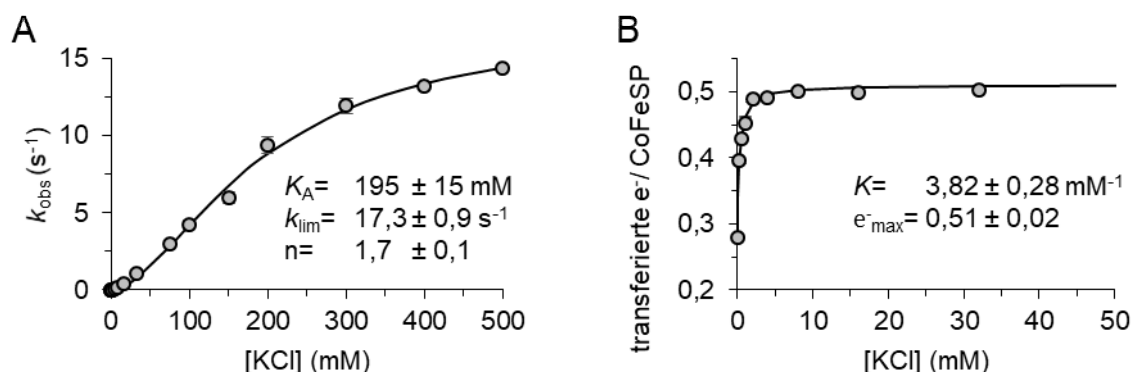


Abbildung 3-9. Einfluss der KCl-Konzentration auf den Elektronentransfer von Co(I)FeSP:RACo^{red}. A zeigt die Geschwindigkeitskonstante und B die transferierten Elektronen je CoFeSP in Abhängigkeit von der KCl-Konzentration. Die mathematische Anpassung der Daten erfolgte unter Verwendung der Hill-Gleichung (A) und der Langmuir-Isothermen-Gleichung (B).

Aus dem Langmuir-Koeffizienten der transferierten Elektronen in Abhängigkeit von der KCl-Konzentration ($K = 3,82 \pm 0,28 \text{ mM}^{-1}$) kann ein K_D von $0,26 \pm 0,02 \text{ mM}$ errechnet werden. Das entspricht der KCl-Konzentration, bei der die Hälfte der maximal transferierten Elektronen übertragen wird. Damit ist die KCl-Konzentration, bei welcher die Hälfte der limitierenden Geschwindigkeitskonstante erreicht wird ($K_A = 195 \pm 15 \text{ mM}$), 750-mal größer.

Storer und Cornish-Bowden konnten zeigen, dass sich die katalytisch aktive Spezies (MgATP^{2-}) bevorzugt bei 1 mM-Überschuss von MgCl_2 zu ATP bildet¹³³. Für verschiedene Vertreter der ASKHA-Familie konnten die höchsten spezifischen Aktivitäten jedoch auch bei geringeren MgCl_2 -Konzentrationen gemessen werden^{134,135}. Daher wurde untersucht, wie die optimale MgCl_2 -Konzentration unter diesen Bedingungen ist. In diesem Experiment wurden abweichend vom vorigen 2 mM ATP verwendet. Aus Abbildung 3-10 kann entnommen werden, dass die höchste Geschwindigkeitskonstante des Elektronenübergangs bei 7 mM und damit 5 mM über der verwendeten ATP-Konzentration lag. Die Anzahl der übertragenen Elektronen blieb mit 0,51 konstant.

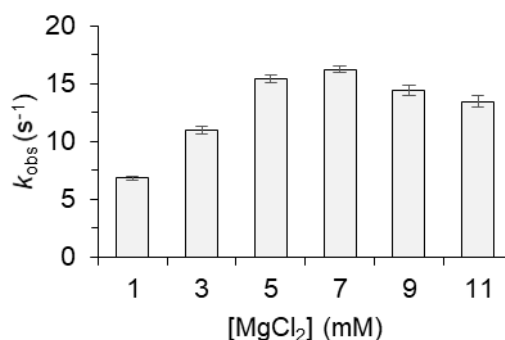


Abbildung 3-10. Abhängigkeit des Elektronenübergangs von der MgCl_2 -Konzentration.

Durch die optimierten Bedingungen konnte die Geschwindigkeitskonstante des Elektronenübergangs bei 2 mM ATP von $4,8 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ auf $16,2 \text{ s}^{-1}$ erhöht werden⁷⁷. Dies ermöglichte die Bestimmung des ratenlimitierenden Schrittes und eine tiefergehende kinetische Analyse des Mechanismus.

Hierfür wurde zunächst der Einfluss der ATP-Konzentration auf den Elektronenübergang untersucht. Abbildung 3-11 zeigt die Bestimmung der Dissoziationskonstanten unter *rapid-equilibrium*-Bedingungen bei 500 mM KCl, 150 mM NH₄Cl und 500 mM KCl + 150 mM NH₄Cl.

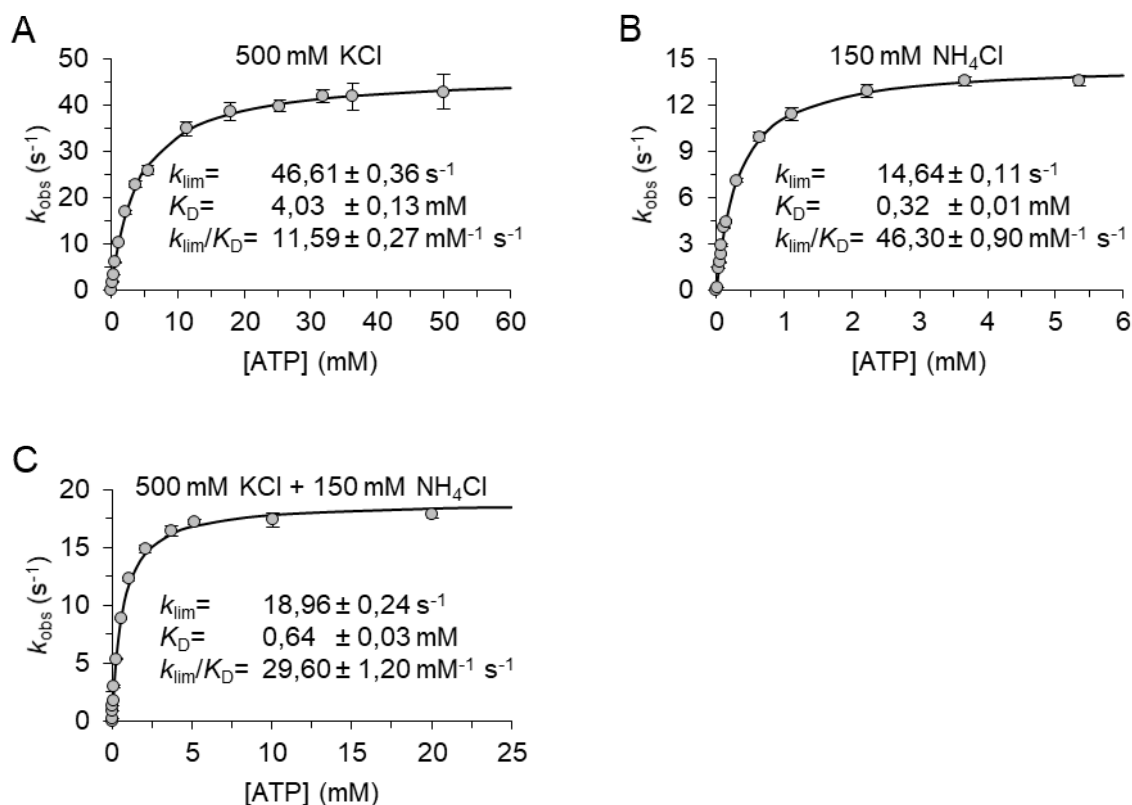


Abbildung 3-11. Bestimmung der K_D - und k_{lim} -Werte von ATP unter Einfluss verschiedener Salze.

Die Bestimmung der Parameter erfolgte unter Verwendung von 500 mM KCl (A), 150 mM NH₄Cl (B) und 500 mM KCl + 150 mM NH₄Cl (C). Die Anpassung der Daten erfolgte mittels *rapid-equilibrium*-Regression.

Die Sättigung der Geschwindigkeitskonstanten bei den jeweiligen ATP-Konzentrationen zeigte, dass nicht die Bindung, sondern ein nachfolgender Schritt limitierend für den Elektronentransfer ist. Die Dissoziationskonstanten und limitierenden Geschwindigkeitskonstanten waren dabei abhängig von den anwesenden Ionen. Unter 500 mM KCl wurde sowohl der höchste k_{lim} von $46,61 \pm 0,36 \text{ s}^{-1}$ als auch der höchste K_D von $4,03 \pm 0,13 \text{ mM}$ gemessen. Die Verwendung von 150 mM NH₄Cl führte zu einem deutlich geringeren K_D -Wert von $0,32 \pm 0,01 \text{ mM}$ und zu einem etwa dreimal kleineren k_{lim} von $14,62 \pm 0,11 \text{ s}^{-1}$. Der Einsatz von beiden Salzen in den jeweiligen Konzentrationen ergab mit einem K_D von $0,64 \pm 0,03 \text{ mM}$

und einem k_{lim} von $18,96 \pm 0,24 \text{ s}^{-1}$ vergleichbare Werte zu 150 mM NH_4Cl . Die katalytische Effizienz ($k_{\text{lim}}/K_{\text{D}}$) lag mit $29,6 \pm 1,2 \text{ mM s}^{-1}$ zwischen den Werten von 500 mM KCl ($k_{\text{lim}}/K_{\text{D}}=11,59 \pm 0,27 \text{ mM s}^{-1}$) und 150 mM NH_4Cl ($k_{\text{lim}}/K_{\text{D}}=46,3 \pm 0,9 \text{ mM s}^{-1}$). Auch bei diesen Messungen blieb die Anzahl der übertragenen Elektronen in einem Bereich von 0,51 – 0,55 annähernd konstant.

Eine Möglichkeit, wie NH_4^+ und K^+ den Elektronentransfer beeinflussen könnten, ist die Veränderung der Interaktionen zwischen RACo und CoFeSP. Die Ionen könnten den Proteinkomplex $\text{Co(II)FeSP:RACo}^{\text{red}}$ stabilisieren oder destabilisieren und so die Kinetik des Elektronentransfers beeinflussen^{136,137}. Wie aus der Struktur des Proteinkomplexes zu erkennen ist, öffnet die Komplexbildung die ATP-Bindungstasche und erhöht die Rate der ATP-Hydrolyse¹⁰⁰. Daher wurde untersucht, welchen Einfluss NH_4^+ und K^+ in den jeweiligen Konzentrationen auf die Bildung des Proteinkomplexes haben. Dazu wurde die Änderung der Tryptophan-Fluoreszenz bei der Bildung des Proteinkomplexes über die Zeit verfolgt und die kinetischen Konstanten k_{on} und k_{off} gemäß Abschnitt 2.9.5 bestimmt (Abb. 3-12).

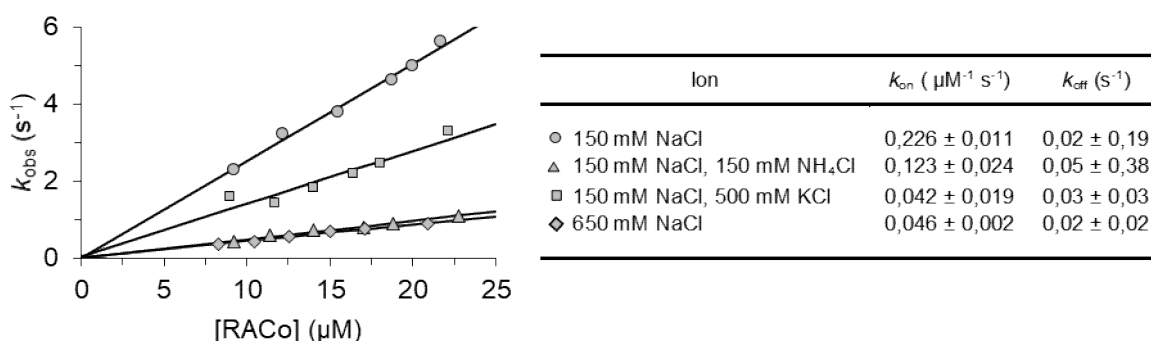


Abbildung 3-12. Einfluss von (●) 150 mM NaCl, (■) 150 mM NaCl + 150 mM NH_4Cl , (◆) 150 mM NaCl + 500 mM KCl und (▲) 650 mM NaCl auf die Komplexbildung von RACo^{ox} und Co(II)FeSP .

Die Geschwindigkeitskonstanten der Komplexassoziation nehmen mit zunehmender Ionenstärke ab. 150 mM NaCl + 500 mM KCl führen mit einem k_{on} von $0,042 \pm 0,019 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ zu einem vergleichbaren Wert wie mit 650 mM NaCl ($k_{\text{on}} = 0,046 \pm 0,002 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$). Schwächere Ionenkonzentrationen wie 150 mM NaCl ($k_{\text{on}} = 0,226 \pm 0,011 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) und 150 mM NaCl + 150 mM NH_4Cl ($k_{\text{on}} = 0,123 \pm 0,024 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) führen zu höheren Assoziationsraten. Die Geschwindigkeitskonstanten der Komplexdissoziation waren unter den verschiedenen Bedingungen annähernd gleich. Die Standardabweichung war jedoch unter allen Bedingungen größer oder gleich der Geschwindigkeitskonstanten der Dissoziationen. Auf die Berechnung der K_{D} -Werte wurde daher verzichtet. Dennoch wiesen die Geschwindigkeitskonstanten der Komplexassoziation und –dissoziation auf keinen spezifischen Einfluss von K^+ oder NH_4^+ auf die Interaktionen zwischen RACo und CoFeSP hin.

3.4 Untersuchung des ratenlimitierenden Schrittes und der Reversibilität des Elektronentransfers

Wie im Abschnitt 3.3 gezeigt, gibt es nach der Bindung von ATP einen ratenlimitierenden Schritt für den Elektronentransfer. Um zu untersuchen, ob es sich bei diesem Schritt um die Hydrolyse von ATP handelt, wurde versucht, den Elektronentransfer durch Zugabe von nicht-hydrolysierbaren ATP-Analoga oder ADP zu induzieren. Da mit 500 mM KCl die höchsten Geschwindigkeitskonstanten gemessen werden konnten, wurden diese Bedingungen für alle nachfolgenden Analysen gewählt. In Abbildung 3-13 ist zu erkennen, dass ADP, ATP γ S und AMP-PCP den Elektronentransfer induzieren können. Dabei wurde mit ADP sowohl die höchste Geschwindigkeitskonstante von 0,052 s⁻¹ also auch mit 0,267 die meisten transferierten Elektronen je CoFeSP ermittelt. Die Geschwindigkeitskonstante ist dennoch mehr als 300-mal niedriger als mit ATP und die Anzahl der übertragenen Elektronen liegt in etwa bei der Hälfte.

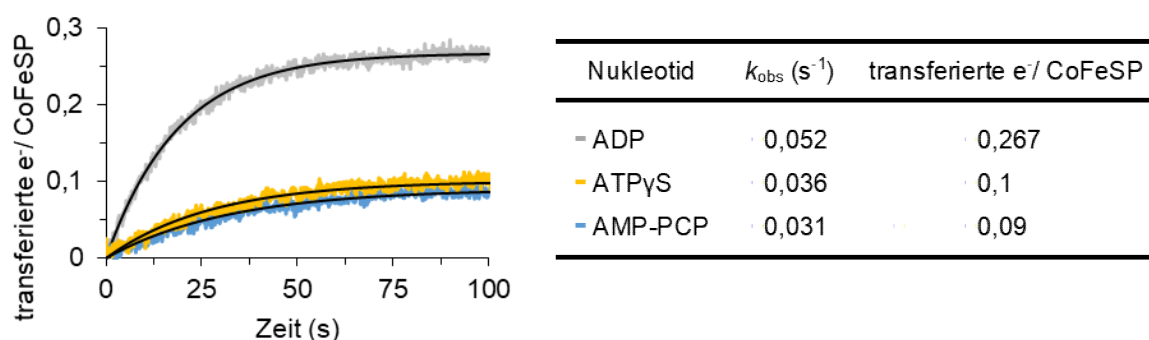


Abbildung 3-13. Elektronentransfer durch Zugabe von 2 mM ADP, ATP γ S oder AMP-PCP. Die Anpassung der Messdaten erfolgte durch exponentielle Regression.

Nach dem Elektronentransfer wurde die Lösung mittels HPLC untersucht, um eine mögliche Hydrolyse auszuschließen. Es konnten keine möglichen Hydrolyseprodukte nachgewiesen werden. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine Konformationsänderung nach der Bindung des Nukleotids den Elektronentransfer induziert. Da nur 0.267 Elektronen pro CoFeSP übertragen wurden, stellte sich die Frage, ob der Elektronentransfer unidirektional oder reversibel ist. Für eine Reversibilität müssten auch Elektronen von Co(I)FeSP auf RACo^{ox} übertragen werden können und die Anzahl der übertragenen Elektronen von der Konzentration von ADP abhängig sein. Das heißt, das Gleichgewicht müsste sich gemäß des Schemas RS2-2 durch Konzentrationserhöhung von ADP in Richtung Co(I)FeSP:RACo^{ox}:ATP verschieben. Um eine Abhängigkeit dieses möglichen Gleichgewichts von der ADP-Konzentration zu untersuchen, wurde zum Proteinkomplex Co(II)FeSP:RACo^{red} schrittweise ADP pipettiert und über die Absorptionsänderung bei 390 nm die Anzahl der übertragenen

Elektronen berechnet. In Abbildung 3-14 ist ein direkter Einfluss der ADP-Konzentration auf die Anzahl der übertragenen Elektronen zuerkennen. Durch Erhöhung der ADP-Konzentration werden mehr Elektronen von reduzierten RACo auf Co(II)FeSP übertragen. Der Elektronentransfer scheint der Gleichgewichtsreaktion RS2-2 zu folgen.

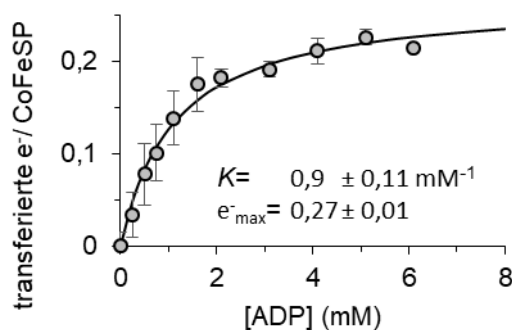


Abbildung 3-14. Anzahl der transferierten Elektronen in Abhängigkeit zur ADP-Konzentration.

Zur mathematischen Anpassung wurde die Langmuir-Isotherme verwendet. Zum Verständnis ist unter dem Graphen die angenommene Gleichgewichtsreaktion (RS2-2) gezeigt.

Wie beschrieben muss für eine Reversibilität des Elektronentransfers unter denselben Bedingungen auch ein Transport des Elektrons von Co(I)FeSP auf RACo^{ox} erfolgen. Um das zu untersuchen wurde CoFeSP mit Titan(III)citrat reduziert und das Titan(III)citrat mittels eines Konzentrations-Verdünnungs-Zyklus gemäß Abschnitt 2.11 wieder weitgehend entfernt. Dabei wurde Co(I)FeSP durch 2 mM DTT im Puffer in seiner reduzierten Form gehalten. Da es unter diesen Bedingungen zu keiner Reduktion des $[\text{2Fe2S}]$ -Clusters von RACo kommt, könnte das Elektron von Co(I)FeSP auf RACo^{ox} übertragen werden. Zunächst wurde mittels UV/Vis-Spektroskopie überprüft, ob Co(I)FeSP nach dem Konzentrations-Verdünnungs-Zyklus reduziert vorliegt. Abbildung 3-15A zeigt das Spektrum des so präparierten CoFeSP im Vergleich mit oxidiertem und durch Titan(III)citrat reduziertem CoFeSP. Es ist zu erkennen, dass Co(I)FeSP bei einer Konzentration von 2 mM DTT reduziert bleibt. Um zu analysieren, ob Co(I)FeSP unter den genutzten Bedingungen Elektronen auf RACo^{ox} übertragen kann, wurden 5 μM RACo^{ox} und 2 mM ADP in ETR-Puffer gegeben und mit 5 μM Co(I)FeSP gemischt. Dieses Experiment wurde analog mit RACo^{red} durchgeführt. Ein Elektronentransfer sollte dabei nur von Co(I)FeSP auf RACo^{ox} messbar sein. Zur Detektion wurde die Absorption bei 390 nm gemessen. In Abbildung 3-15B ist zu erkennen, dass die Absorption bei 390 nm nur in Gegenwart von RACo^{ox} abnimmt.

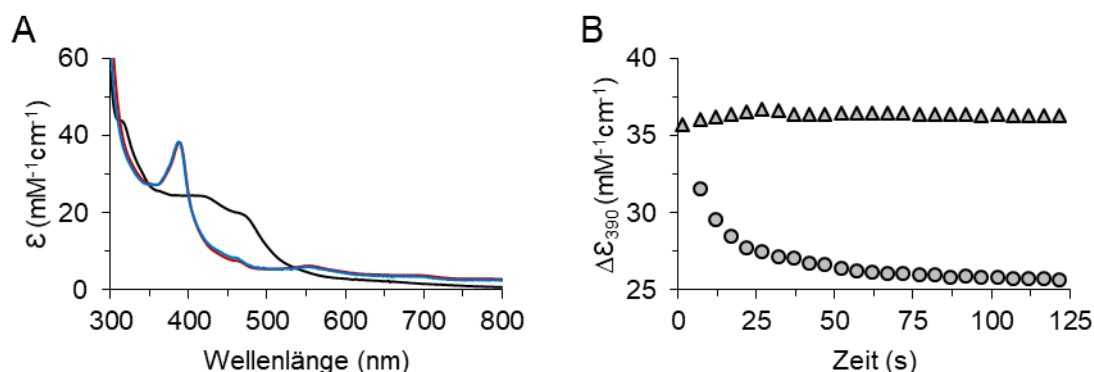


Abbildung 3-15. UV/Vis-Spektren von CoFeSP und Elektronentransfer von Co(I)FeSP auf RACo.

A zeigt die UV/Vis-Spektren von Co(II)FeSP (schwarz), Co(I)FeSP reduziert mit Titan(III)citrat (rot) und Co(I)FeSP (blau) nach Entfernung des Titan(III)citrat mittels Konzentrations-Verdünnungs-Zyklus. In B ist die Absorptionsänderung über die Zeit bei Zugabe von Co(I)FeSP zu RACo^{ox} (●) und RACo^{red} (▲) abgebildet.

Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass der ratenlimitierende Schritt des Elektronentransfers eine Konformationsänderung nach der Bindung des Nukleotids ist und sich ein Gleichgewicht gemäß des Reaktionsschemas RS2-2 ausbildet.

Um dieses Ergebnis zu bestätigen wurde die Rate der Hydrolyse bei variierenden ATP-Konzentrationen bestimmt. Dazu wurde die Elektronentransferreaktion von 10 μM Co(II)FeSP:RACo^{red} durch Zugabe von Trichloressigsäure zu verschiedenen Zeitpunkten gestoppt und das entstandene ADP mittels HPLC quantifiziert. Zur Konzentrationsbestimmung wurde eine Kalibriergerade erstellt (Abb. 7-6, Anhang). Dabei wurden ATP-Konzentrationen in der Größenordnung des gemessenen K_D -Werts (4 mM) gewählt. Da die vorhergehenden Ergebnisse auf einen reversiblen Elektronentransfer hindeuten, sollte sich zuerst ein *presteady state* mit anschließenden *steady state* ausbilden. Im *steady state* müsste das Elektron bidirektional zwischen beiden Redox-Zentren übertragen werden. Dabei sollte in jedem Reaktionszyklus des *uphill* Elektronentransfers ATP hydrolysiert werden. Dem zu Folge sollte eine mono-exponentielle Zunahme gefolgt von einer linearen Zunahme der ADP-Konzentration zu beobachten sein. Um diese Reaktion mathematisch zu beschreiben, wurde die exponentielle Regression durch die Geschwindigkeitskonstante k_{ss} erweitert (G13). Die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten k_{obs} und k_{ss} sowie die entstehende ADP-Konzentration im mono-exponentiellen Anstieg des Elektronenübergangs blieben in dem Bereich von 1 mM – 7 mM ATP annähernd gleich (3-16).

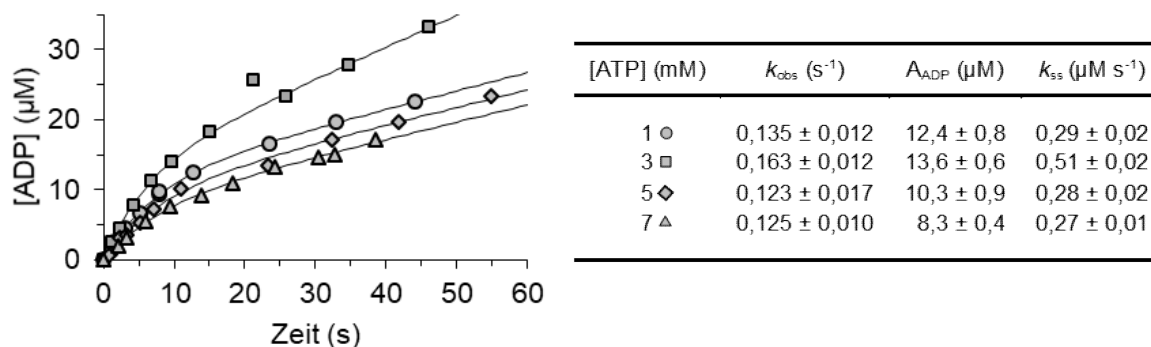


Abbildung 3-16. Quantifizierung der ATP-Hydrolyse bei variierenden ATP-Konzentrationen.

Gezeigt werden die Zunahme der ADP-Konzentration über die Zeit und die aus der mathematischen Annäherung bestimmten kinetischen Parameter gemäß Gleichung 13.

Die Geschwindigkeitskonstanten für die exponentielle Phase des Elektronentransfers lagen im Bereich von $0,123 \pm 0,017 \text{ s}^{-1}$ – $0,163 \pm 0,012 \text{ s}^{-1}$ und waren damit in etwa 100-mal langsamer als die Geschwindigkeitskonstanten des Elektronenübergangs bei den jeweiligen Konzentrationen. Dies bestätigt, dass die Hydrolyse von ATP nicht ratenlimitierend für den Elektronenübergang ist. Es war kein Anstieg der gemessenen Geschwindigkeitskonstanten bei Erhöhung der ATP-Konzentration zu erkennen, was darauf hindeutet, dass die limitierende Rate bei den genutzten ATP-Konzentrationen annäherungsweise erreicht wurde. Mit der Geschwindigkeitskonstante k_{ss} ließ sich eine *turnover number* von $0,027 \pm 0,001 \text{ s}^{-1}$ – $0,051 \pm 0,002 \text{ s}^{-1}$ berechnen. Die berechnete Konzentration des entstandenen ADP für die mono-exponentielle Annäherung des Elektronentransfers von $8,3 \mu\text{M}$ – $13,6 \mu\text{M}$ waren in annähernd äquimolar zur eingesetzten Konzentration von $\text{Co(II)FeSP:RACo}^{\text{red}}$. Da unter diesen Bedingungen 0,51 transferierte Elektronen pro CoFeSP gemessen wurden, entspräche das der Hydrolyse von zwei ATP pro transferiertem Elektron.

Wie gezeigt wurde, ist auch ein Elektronentransfer von Co(I)FeSP auf RACo^{ox} möglich, welcher durch die Reduktion von RACo^{ox} verhindert werden kann (Abb. 3-15). Das reduzierende Milieu des Zytosols von *Carboxydotherrmus hydrogenoformans*¹³⁸ legt nahe, dass RACo vorrangig im reduzierten Zustand vorliegt. Eine erneute Reduktion des $[\text{2Fe2S}]$ -Clusters von RACo nach dem Elektronentransfer könnte den „Rücktransfer“ des Elektrons verhindern. Um diese Hypothese näher zu untersuchen, wurde bei einem pH-Wert von 9 zu dem Proteinkomplex $\text{Co(II)FeSP:RACo}^{\text{ox}}$ 2 mM ATP gegeben und der ATP-gekoppelte Elektronentransfer durch Zugabe von DTT gestartet. Bei pH-Wert 9 kann das $[\text{2Fe2S}]$ -Cluster von RACo durch DTT reduziert werden, wodurch die Rate des Elektronentransfers von der Reduktionsrate von RACo abhängig wird. Durch eine erneute Reduktion von RACo nach dem Elektronentransfer sollte der „Rücktransfer“ verhindert und somit mehr übertragende Elektronen pro CoFeSP gemessen werden. In einem weiteren Versuch wurde zum Vergleich

die Geschwindigkeitskonstante der Reduktion von RACo im Komplex mit Co(II)FeSP bestimmt. Diese kann durch die Abnahme der Absorption bei 460 nm verfolgt werden (Abb. 3-5). In Abbildung 3-17 ist zu erkennen, dass sich unter diesen Reaktionsbedingungen die Anzahl der transferierten Elektronen auf 0,93 pro CoFeSP erhöhte (Abb. 3-17 B). Die Geschwindigkeitskonstante der Reduktion von RACo^{ox} (Abb. 3-17 A) entsprach annähernd der Geschwindigkeitskonstante des gemessenen Elektronenübergangs.

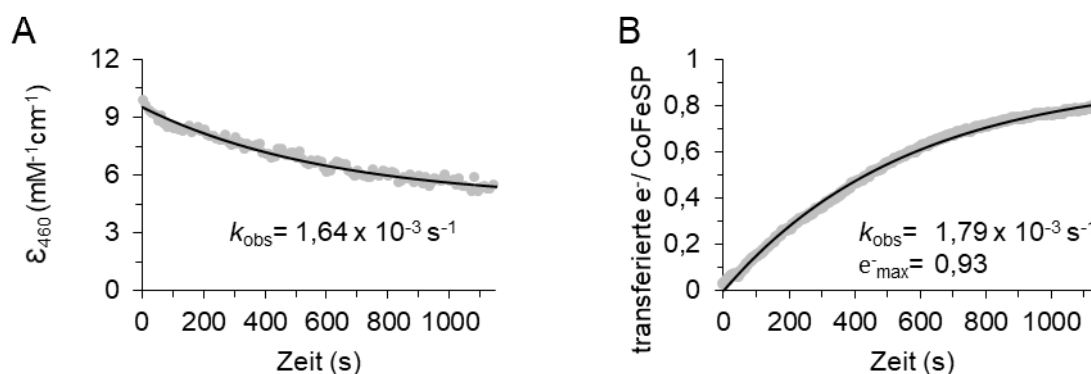


Abbildung 3-17. Elektronentransfer und Reduktion von RACo im Komplex Co(II)FeSP:RACo^{ox} durch Zugabe von DTT. In beiden Messungen wurde zu dem Komplex Co(II)FeSP:RACo^{ox} 2 mM DTT gegeben. A zeigt die Reduktion von RACo im Proteinkomplex gemessen bei 460 nm. B enthält zusätzlich 2 mM ATP, wodurch der Elektronentransfer von RACo^{ox} auf Co(II)FeSP induziert wird.

Die Beobachtungen deuten darauf hin, dass der „Rücktransfer“ des Elektrons durch eine erneute Reduktion von RACo verhindert werden kann.

3.5 Komplex- und Phosphat-Dissoziation nach Elektronentransfer

Zur weiteren Charakterisierung des Reaktionsmechanismus wurden Interaktionen zwischen RACo und Co(I)FeSP untersucht. Aus vorherigen Studien konnte eine Dissoziationskonstante des Proteinkomplexes Co(II)FeSP:RACo^{ox} durch isothermale Titrationskalorimetrie von 6.7 nM^{100} und durch Förster-Resonanzenergietransfer-Spektroskopie von $0.44 \text{ }\mu\text{M}^{105}$ bestimmt werden. Durch die Reduktion von Co(II)FeSP zu Co(I)FeSP werden die Interaktionen zu RACo verringert^{77,100}. Eine Dissoziationskonstante der Produkte des Elektronenübergangs Co(I)FeSP und RACo^{ox} konnte jedoch noch nicht bestimmt werden. Wie in Abschnitt 3.4 gezeigt wurde, kann Co(I)FeSP ein Elektron auf RACo^{ox} transferieren. Dieser Elektronentransfer wurde genutzt, um die Interaktionen zwischen Co(I)FeSP und RACo^{ox} zu bestimmen. Dazu wurde Co(I)FeSP zu einem mindestens 10-fachen Überschuss von RACo^{ox} gegeben und die Abnahme der Absorption bei 390 nm detektiert (Abbildung 3-18 A). Die daraus bestimmten Geschwindigkeitskonstanten zeigten einen linearen Verlauf in Abhängigkeit zur

Konzentration von RACo^{ox} (Abbildung 3-18 B). Durch lineare Regression nach Gleichung 11 konnten daraus die kinetischen Bindungskonstanten bestimmt werden.

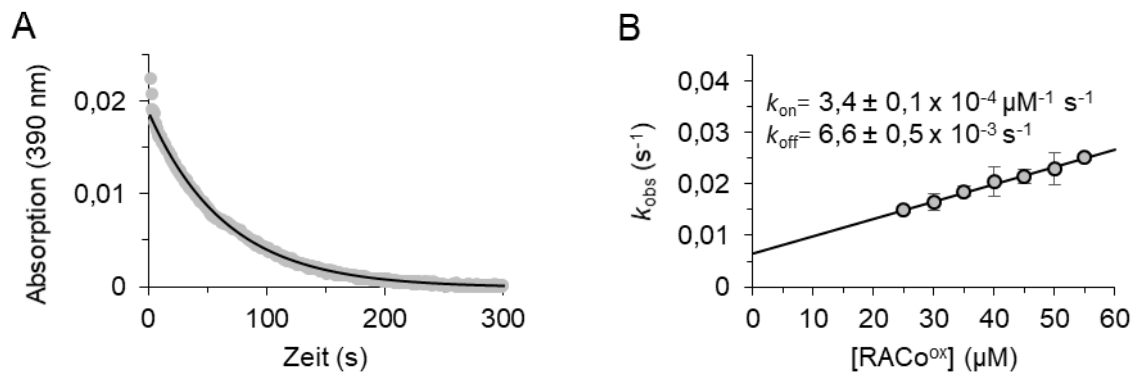


Abbildung 3-18. Bestimmung der Bindungskonstanten durch den Elektronentransfer von Co(I)FeSP auf RACo^{ox} . In A ist die Abnahme der Absorption bei 390 nm bei Zugabe von 25 μM RACo^{ox} zu 2,5 μM Co(I)FeSP dargestellt. Die Geschwindigkeitskonstante konnte durch exponentielle Regression bestimmt werden. B zeigt die lineare Abhängigkeit von k_{obs} zur Konzentration von RACo^{ox} .

Mit den bestimmten Geschwindigkeitskonstanten k_{on} und k_{off} konnte eine Dissoziationskonstante (K_{D}) von 19,4 μM berechnet werden. Dieses Ergebnis bestätigt die Abnahme der Interaktionen durch Reduktion von CoFeSP . Von dem strukturverwandten Protein Aktin ist bekannt, dass es nach der Hydrolyse ADP und P_i gebunden hält¹³⁹. Die Dissoziation des Orthophosphates führt zu strukturellen Veränderungen, welche die Dissoziation der Aktin-Monomere im Filament unterstützt. Für einen Komplex aus RACo und CoFeSP wäre denkbar, dass ein Intermediat bestehend aus Proteinkomplex mit gebundenem ADP und P_i entsteht. Für die Entstehung des Intermediat müsste die Geschwindigkeitskonstante k_{obs} der Dissoziation des Orthophosphates langsamer sein als die der Hydrolyse. Die Detektion der Phosphatdissoziation erfolgte mittels MDCC-PBP nach Brune et al.¹¹³. MDCC-PBP zeigt eine Fluoreszenzzunahme bei der Bindung von Orthophosphat im Bereich von ca. 425 – 500 nm bei einer Anregungswellenlänge von 425 nm. Eine schnelle Assoziation des Orthophosphates ermöglicht die Messung von Raten bis 100s^{-1} , so dass MDCC-PBP sowohl bei strukturverwandten als auch mechanistisch-ähnlichen Proteinen zur näheren Charakterisierung verwendet wurde^{140,141}. Der zeitabhängige Verlauf der Dissoziation des Orthophosphates war ähnlich dem der ATP-Hydrolyse (Abb. 3-19A). Die errechnete limitierende Geschwindigkeitskonstante war vergleichbar zur Hydrolyse (Abb. 3-19B).

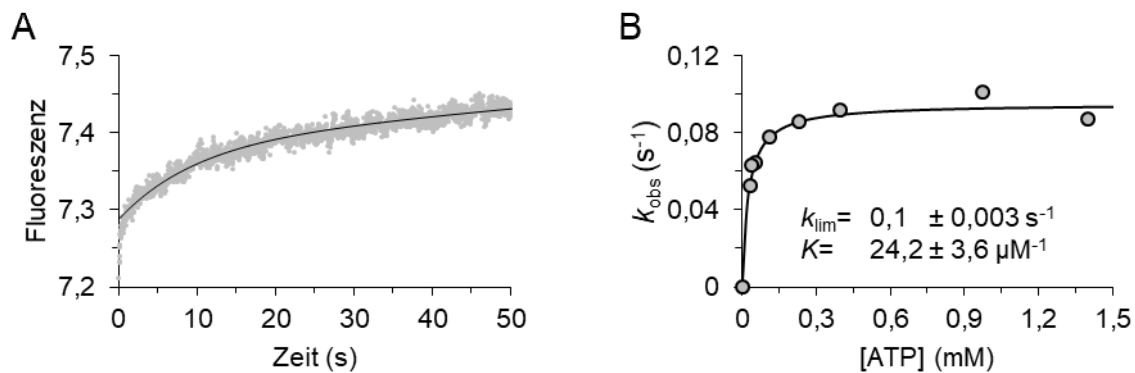


Abbildung 3-19. Bestimmung der P_i -Dissoziation in der Elektronentransferreaktion von $\text{Co(II)FeSP:RACo}^{\text{red}}$. (A) Fluoreszenzänderung durch die Bindung des Orthophosphats an MDCC-PBP über die Zeit. (B) Hyperbole Anpassung der gemessenen Geschwindigkeitskonstanten in Abhängigkeit zur ATP-Konzentration.

Die vergleichbaren limitierenden Geschwindigkeitskonstanten der P_i -Dissoziation ($0,1 \text{ s}^{-1}$) zu der Hydrolyse ($0,123 \pm 0,017 \text{ s}^{-1} - 0,163 \pm 0,012 \text{ s}^{-1}$) ließen darauf schließen, dass die ATP-Hydrolyse der ratenlimitierende Schritt der P_i -Dissoziation ist. Die Entstehung eines phosphatgebundenen Proteinkomplexes nach Hydrolyse ist daher unwahrscheinlich.

Durch die annähernd zeitgleiche ATP-Hydrolyse und Dissoziation des Orthophosphates könnte ein Proteinkomplex mit gebundenem ADP entstehen. Um den Einfluss von ADP auf die Interaktionen von Co(I)FeSP und RACo^{ox} zu untersuchen, wurde der Elektronentransfer von Co(I)FeSP auf RACo^{ox} in Anwesenheit von ADP gemessen. Im Vergleich zu den Interaktionsstudien ohne ADP erhöhte sich k_{off} ($2,7 \pm 0,01 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$) auf das 40-fache, während sich die k_{on} ($6,7 \pm 0,29 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) in etwa halbierte (Abb. 3-20). Die aus diesen Werten ermittelte Dissoziationskonstante von $403 \mu\text{M}$ war 20-mal höher als ohne ADP ($19,4 \mu\text{M}$).

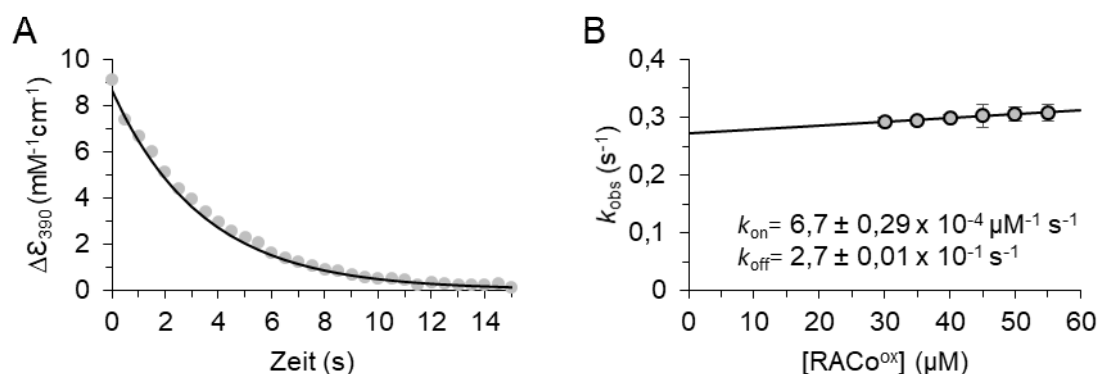


Abbildung 3-20. Elektronentransfer von Co(I)FeSP auf RACo^{ox} in Anwesenheit von 10 mM ADP. A zeigt ist die Abnahme der Absorption bei 390 nm und die Bestimmung Geschwindigkeitskonstante durch exponentielle Regression. B zeigt die lineare Abhängigkeit von k_{obs} zur Konzentration von RACo^{ox} .

4 Diskussion

4.1 Rekombinante Genexpression und Proteinreinigung

Abweichend von der etablierten Strategie wurde der Expressionsvector für RACo zusammen mit pRKISC in Rosetta (DE3) transformiert und die rekombinante Genexpression nach einem *cold shock* bei OD₆₀₀ von 1,2 induziert. Die gewählten Bedingungen führten zu einer erhöhten Expression und steigerten den Cofaktorgehalt auf ca. 100 %. Die Analyse des Proteins mittels SDS-PAGE zeigte eine hohe Reinheit des Proteins, sodass Effekte durch Fremdproteine weitestgehend ausgeschlossen werden konnten.

Die separate Kultivierung und Expression von *acsC* (codierend für CfsA) und *acsD* (codierend für CfsB) erhöhte die Ausbeuten beider Proteine. Durch Cotransformation mit pRKISC in Rosetta (DE3) und der Induktion der rekombinanten Genexpression nach einem *cold shock* bei einer OD₆₀₀ von 1,2 konnte zudem die Bildung von *Inclusion Bodies* umgangen werden. Die Bande der kleinen Untereinheit wirkt in der SDS-PAGE etwas stärker ausgeprägt als die der großen Untereinheit, was gegen ein molares Verhältnis von 1:1 der beiden Untereinheiten spricht. Coomassie Brilliant Blue G-250 interagiert jedoch unterschiedlich stark mit verschiedenen Aminosäuren und zeigt besonders mit basischen Aminosäuren stärkere Interaktionen¹⁴². Die Sequenz der kleinen Untereinheit enthält prozentual mehr basische Aminosäuren¹⁴³, was eine stärkere Färbung der Bande durch Coomassie Brilliant Blue G-250 zur Folge hatte. Des Weiteren zeigten beide Untereinheiten Interaktionen mit dem Cobalamin^{84,101}. Für eine effiziente Bindung des Cofaktors sollte demnach die korrekte Ausbildung des Proteinkomplexes aus beiden Untereinheiten wichtig sein. Der Cofaktorgehalt des Cobalamins konnte jedoch mit annähernd 100 % bestimmt werden. Diese Umstände sprechen für ein molares Verhältnis von 1:1 der beiden Untereinheiten. Der Cofaktorgehalt des [4Fe4S]-Clusters konnte auch mit annähernd 100 % bestimmt werden. Die UV/Vis-Spektren von RACo und CoFeSP zeigten höhere Extinktionskoeffizienten als bisher publiziert⁸⁴, was wahrscheinlich auf den höheren Cofaktorgehalt beider Proteine zurückzuführen ist.

Durch die etablierte Expressions- und Reinigungsstrategie nach Solscheid et al. konnte das PBP nur im weitestgehend gesättigten Zustand isoliert werden¹²¹. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass das Phosphat bei 2 M Guanidiniumchlorid vom Protein dissoziiert (Abb. 3-3). Dadurch konnte das gebundene Phosphat noch während der Reinigung entfernt werden, was eine Behandlung mit 7-Methylguanosin und der Purin-Nucleosid-Phosphorylase überflüssig machte.

4.2 Optimierung der Reaktionsbedingungen der Elektronentransferreaktion von reduziertem RACo auf Co(II)FeSP

RACo konnte nach der Reduktion mit DT unter Verwendung von 2 mM β -Mercaptoethanol im reduzierten Zustand gehalten werden (Abb. 3-5A). Die Absorption im Bereich von 400 – 470 nm ist sogar geringer als nach der Reduktion mit 2 mM DTT. Das weist darauf hin, dass mit DTT keine vollständige Reduktion erreicht wurde^{77,144}. Die höhere Absorption bis 350 nm ist wahrscheinlich auf oxidiertes DTT zurückzuführen. Durch die Oxidation von DTT kommt es zu einem intramolekularen Ringschluss über eine Disulfidbrücke und einer Zunahme der Absorption im Bereich von 240 – 360 nm¹²⁶. Durch die Änderungen der Reaktionsbedingungen zur Messung des Elektronentransfers konnte der Einfluss des Reduktionsmittels auf das Absorptionsspektrum weitgehend ausgeschlossen werden. Des Weiteren konnte eine mögliche Komplexbildung des DTT mit dem Co^{2+} des Cobalamins¹²⁷ umgangen werden. Abweichend von der zuvor etablierten Methode erfolgte die Komplexbildung der Proteine erst nach Reduktion des [2Fe2S]-Clusters von RACo. Dass dadurch die Interaktionen der Proteine beeinflusst werden ist unwahrscheinlich, da der gesamten Ferredoxin-Domäne keine stark beeinflussende Wirkung auf die Komplexbildung nachgewiesen werden konnte¹⁰⁰. Da das Reduktionspotential von β -Mercaptoethanol nicht ausreichend negativ ist, um das [2Fe2S]-Cluster von RACo zu reduzieren, erfolgt während des Elektronentransfers keine erneute Reduktion. Das ermöglichte die Effizienz des Elektronentransfers (transferierte e^- / CoFeSP) zu bestimmen.

Im Vergleich der Differenzspektren ist zu erkennen, dass die Vermeidung von DTT als Reduktionsmittel zu einer größeren Übereinstimmung zu dem berechneten Differenzspektrum im Bereich von 300 – 360 nm führt. Der Grund hierfür könnte die Reduktion von RACo^{ox} durch DTT nach dem Elektronentransfer sein. Dadurch entstehen erneut oxidiertes DTT und reduziertes RACo, was zu einer Zunahme der Absorption von 300 – 360 nm führt^{77,126}. Gleichzeitig sollte jedoch die Absorption von 400 – 600 nm durch Reduktion von RACo abnehmen⁷⁷, was zu geringeren Absorptionswerten als das berechnete Differenzspektrum führen sollte. Das ist im gemessenen Differenzspektrum mit DTT als Reduktionsmittel jedoch nicht zu sehen. Von 420 – 500 nm ist die Absorption des Differenzspektrums unter Verwendung von DTT dennoch näher an dem berechneten Differenzspektrum. Da die Ergebnisse aber nicht auf einen unidirektionalen Elektronenübergang hindeuten, ist die Interpretation der Differenzspektren im Allgemeinen problematisch. Das berechnete UV/Vis-Differenzspektrum wurde aus den spektralen Änderungen von reduzierten zu oxidierten RACo und dem Übergang Co(II)FeSP zu Co(I)FeSP ermittelt. Es konnte nicht eindeutig bestimmt werden, durch welchen Schritt die Proteine voneinander dissoziieren. Wenn sich nach Zugabe von ATP ein *steady state* ausbildet, könnte ein Anteil der Proteine im Komplex vorliegen, was sich auf das Absorptionsspektrum auswirken könnte. Bei anderen Vertretern der ASKHA-

Proteine wirken sich die ATP-Bindung, -Hydrolyse und die Dissoziation von ADP und P_i maßgeblich auf die jeweiligen Protein-Protein-Interaktionen aus^{44,48,50,145–147}. Aber auch bei mechanistisch-ähnlichen Proteinen wie der Nitrogenase ändern die ATP-Bindung und die P_i -Dissoziation die Stärke der Interaktionen der Untereinheiten¹⁴⁸.

4.3 Auswirkung verschiedener Kationen auf den ATP-gekoppelten Elektronentransfer

Hennig et al. haben gezeigt, dass der Proteinkomplex Co(II)FeSP:RACo^{red} für den ATP-gekoppelten Elektronentransfer Mg^{2+} und K^+ benötigt⁷⁷. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass in Anwesenheit von 2 mM der einzelnen Ionen oder 2 mM NH_4^+ der Elektronentransfer durch ATP-Zugabe induziert werden kann (Abb. 3-6). Eine Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von diesen Kationen konnte schon für andere ASKHA-Domänen-Proteine beobachtet werden^{94,132,149}. Von allen getesteten Kationen wurden mit NH_4^+ sowohl der höchste k_{obs} als auch die meisten transferierten Elektronen je CoFeSP gemessen, was ungewöhnlich für die spezifischen Aktivitäten der Proteine der ASKHA-Familie ist. Die Kombinationen aus Mg^{2+} und NH_4^+ und aus Mg^{2+} und K^+ zeigten eine Zunahme der Geschwindigkeitskonstante und der transferierten Elektronen im Vergleich zur separaten Verwendung der einzelnen Ionen. Für die Kombination aus K^+ und NH_4^+ konnte keine Erhöhung der Geschwindigkeitskonstante und der transferierten Elektronen gemessen werden. Beide Ionen besitzen vergleichbare Ionenradien¹⁵⁰ und könnten um die gleiche Bindungsstelle konkurrieren. Diese Beobachtungen legen die Annahme nahe, dass es unterschiedliche Bindungsstellen für bivalente Mg^{2+} und die beiden monovalenten Kationen gibt. Dass die Kombination von K^+ und NH_4^+ zu vergleichbaren Werten wie bei alleiniger Verwendung von NH_4^+ führt, spricht für eine höhere Affinität von NH_4^+ .

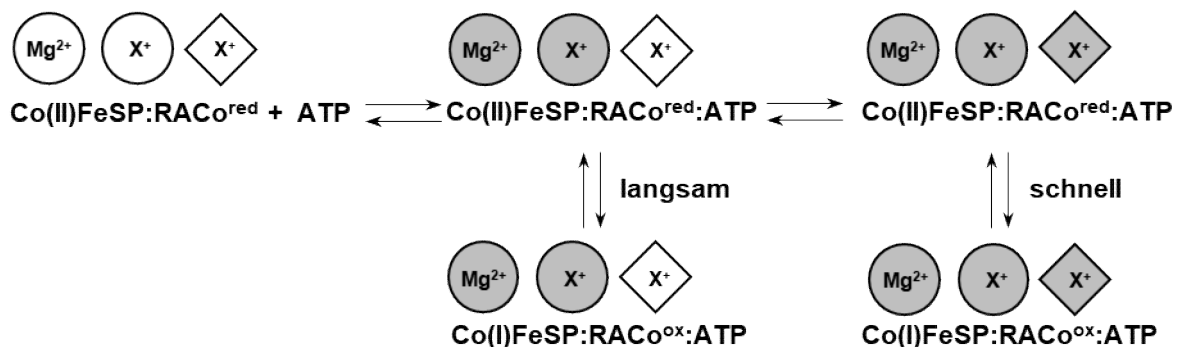
Die kinetischen Parameter in Anwesenheit von jeweils 2 mM Mg^{2+} und NH_4^+ wurden durch doppel-exponentielle Regression bestimmt. Dadurch wurden zwei unterschiedliche Geschwindigkeitskonstanten ($k_{obs1}=0.287\text{ s}^{-1}$; $k_{obs2}=0.046\text{ s}^{-1}$) bestimmt, jedoch vergleichbare Anzahlen der übertragenen Elektronen ($e^-/\text{CoFeSP}_1=0,34$; $e^-/\text{CoFeSP}_2=0,32$). Die Summe aus den bestimmten Amplituden ergab 0,66 transferierte Elektronen pro CoFeSP. Aus der gemessenen Absorptionsänderung nach 100 s konnten jedoch nur 0,57 transferierte Elektronen pro CoFeSP berechnet werden. Diese Diskrepanz ist wahrscheinlich auf Ungenauigkeiten in der mathematischen Annäherung zurückzuführen. Die mathematische Annäherung des Elektronentransfers an das *rapid-equilibrium*-Modell ist an Vereinfachungen und Modellannahmen gebunden¹⁵¹. Diese Faktoren können zu Abweichungen führen, welche mit der Komplexität der Reaktion zunehmen¹⁵². 0,57 transferierte Elektronen pro CoFeSP erscheinen angesichts der gemessenen Absorptionsänderung und der Werte aller Folgeexperimente (0,51 – 0,55 transferierte Elektronen pro CoFeSP) als realistischer.

Die Erhöhung der NH_4^+ - und K^+ -Konzentration bei konstanter Mg^{2+} -Konzentration näherte die Geschwindigkeitskonstanten an limitierende Werte an (Abb. 3-8 und 3-9). Das ist wahrscheinlich auf eine zunehmende Sättigung einer spezifischen Bindungsstelle für die beiden monovalenten Kationen zurückzuführen. Es ist unwahrscheinlich, dass ein Zwei-Ionen-Substrat wie KMgATP^- oder $\text{NH}_4\text{MgATP}^-$ vom Proteinkomplex für die Katalyse der Reaktion genutzt wird. Kalium-Ionen zeigen eine höhere Affinität zu MgATP^{2-} als Ammonium-Ionen¹⁵³. Sowohl der k_{lim} von $18,96 \pm 0,24 \text{ s}^{-1}$ als auch der K_D von $0,64 \pm 0,03 \text{ mM}$ mit $500 \text{ mM KCl} + 150 \text{ mM NH}_4\text{Cl}$ gleichen stärker den Werten von $150 \text{ mM NH}_4\text{Cl}$ ($k_{\text{lim}}=14,64 \pm 0,11 \text{ s}^{-1}$; $K_D=0,32 \pm 0,01 \text{ mM}$) als denen mit 500 mM KCl ($k_{\text{lim}}=46,61 \pm 0,36 \text{ s}^{-1}$; $K_D=4,03 \pm 0,13 \text{ mM}$). Bei der Bildung eines Zwei-Ionen-Substrats sollten die gemessenen Werte von $500 \text{ mM KCl} + 150 \text{ mM NH}_4\text{Cl}$ auf Grund der stärkeren Interaktionen von K^+ mit MgATP^{2-} eher den kinetischen Konstanten bei 500 mM KCl entsprechen. Für die Geschwindigkeitskonstanten des Elektronentransfers in Abhängigkeit von der MgCl_2 -Konzentration konnte jedoch ein Optimum bei 7 mM und damit 5 mM über der ATP-Konzentration ermittelt werden. Das stimmt mit Literaturangaben überein, wobei sich die katalytische aktivste Form MgATP^{2-} bevorzugt bei einem leichten Überschuss der Magnesium-Ionen bildet¹³³.

Die mathematische Annäherung der Geschwindigkeitskonstanten in Abhängigkeit von der KCl-Konzentration erfolgte unter Verwendung der Hill-Gleichung. Der ermittelte Hill-Koeffizient von $1,7$ kann auf zwei Bindungsstellen für K^+ hindeuten¹⁵⁴. Da K^+ und NH_4^+ scheinbar mit den gleichen Bindungsstellen interagieren, könnte die doppel-exponentielle Elektronentransfer-Kinetik in Anwesenheit von Mg^{2+} und NH_4^+ mit der Interaktion des NH_4^+ mit ebenfalls zwei Bindungsstellen erklärt werden. Diese These lässt sich stützen, wenn mit in Betracht gezogen wird, dass die ATP-Hydrolyse in etwa 100-mal langsamer als der Elektronentransfer ist (Abb. 3-11 und 3-16). Daraus folgt, dass die Bindung von ATP genügt, um den Elektronentransfer zu induzieren. Die Anzahl der übertragenden Elektronen korreliert demnach mit der Bindung von ATP. Die transferierten Elektronen pro CoFeSP konnten beim MgATP^{2-} -induzierten Elektronentransfer durch K^+ oder NH_4^+ erhöht werden. Das weist darauf hin, dass beide Ionen die Bindung von ATP unterstützten. Für das ASKHA-Protein Aktin konnte ein ähnlicher Einfluss beobachtet werden. Hier konnten in Anwesenheit von Kalium-Ionen eine höhere Aktivität und strukturelle Änderungen in der ATP-Bindungstasche nachgewiesen werden^{155–157}.

K^+ und NH_4^+ erhöhen nicht nur die Anzahl der übertragenden Ionen, sondern auch die Geschwindigkeitskonstanten (Abb. 3-6 und 3-7). Interessanterweise steigern geringe Konzentrationen von KCl überwiegend die Anzahl der transferierten Elektronen, während höhere KCl-Konzentrationen besonders die Geschwindigkeitskonstanten erhöhen. Die KCl-Konzentration, bei welcher die Hälfte der limitierenden Geschwindigkeitskonstante erreicht wird ($K_A=195 \pm 15 \text{ mM}$) ist 750-mal größer als bei der Hälfte der maximal transferierten Elektronen ($K_D=0,26 \pm 0,02 \text{ mM}$). Die Anzahl der transferierten Elektronen in Abhängigkeit von

der NH_4Cl -Konzentration ist sogar im gemessenen Bereich weitgehend konstant. Für die Raten des Elektronentransfer konnten jedoch kinetische Konstanten von $K_{D1} = 31,75 \pm 2,8 \text{ mM}$ und $K_{D2} = 9 \pm 0,35 \text{ mM}$ für NH_4Cl bestimmt werden. Das deutet darauf hin, dass geringe Konzentrationen von K^+ und NH_4^+ stärker die Bindung von ATP unterstützen, während hohe Konzentrationen stärker das *conformational gating* des Elektrons unterstützen. Durch *conformational gating* könnte, ähnlich zu anderen Proteinen, die Geschwindigkeitskonstante des Elektronentransfers erhöht werden¹⁵⁸. Die Messungen der Geschwindigkeitskonstanten in Abhängigkeit zur ATP-Konzentration zeigen, dass es für den Elektronentransfer einen ratenlimitierenden Schritt gibt (Abb. 3-11). Da die Hydrolyse als ratenlimitierender Schritt ausgeschlossen werden kann, ist eine durch die ATP-Bindung induzierte Konformationsänderung am wahrscheinlichsten. Der Übergang in diese Konformation und damit das *conformational gating* des Elektrons könnte durch die Besetzung einer Bindungsstelle unterstützt werden. Um diese Daten in einem kinetischen Modell miteinander zu verbinden, muss mit in Betracht gezogen werden, dass die Ergebnisse gegen einen unidirektionalen Elektronentransfer sprechen. Nach der Bindung von ATP bildet sich wahrscheinlich ein Gleichgewicht zwischen $\text{Co(II)FeSP:RACo}^{\text{red}}\text{:ATP}$ und $\text{Co(I)FeSP:RACo}^{\text{ox}}\text{:ATP}$ aus. Die Bindung von ATP erhöht die Anzahl der übertragenen Elektronen und wird durch Mg^{2+} und geringere Konzentrationen von K^+ oder NH_4^+ unterstützt. Durch eine weitere Bindung eines der beiden monovalenten Kationen wird eine dritte Bindungsstelle besetzt, welche das *conformational gating* des Elektrons unterstützt und so die Geschwindigkeitskonstante erhöht (Abb. 4-1). Dabei ist die Affinität der Kationen gegenüber der Bindungsstelle für die ATP-Bindung höher als für die Bindungsstelle für das *conformational gating*.



Reaktionsschema 4-1. Mögliche Bindungsstellen für Mg^{2+} , K^+ und NH_4^+ . Der graue Hintergrund zeigt, welche Bindungsstellen die Bildung des jeweiligen Intermediates begünstigen. Bindungsstellen, welche als Kreise dargestellt sind, unterstützen die ATP-Bindung und die Bindungsstelle, welche als Quadrat dargestellt ist, unterstützen das *conformational gating*. X^+ entspricht K^+ oder NH_4^+ . Zwei Bindungsstellen unterstützen die Bindung von ATP und einen langsamen Elektronentransfer. Eine dritte Bindungsstelle unterstützt das *conformational gating* und damit einen schnellen Elektronentransfer.

In diesem Modell erhöhen eine Mg^{2+} - und eine K^+/NH_4^+ -spezifische Bindungsstelle die Bindung von ATP und somit die Anzahl der transferierten Elektronen. Eine dritte Bindungsstelle erhöht die Geschwindigkeit der Hin- als auch der Rückreaktion durch *conformational gating*. Dadurch steigt der k_{obs} des Elektronentransfers ohne die Anzahl der transferierten Elektronen zu verändern. Eine Möglichkeit hierfür wäre die Verringerung des mittleren Abstands der beiden Redox-Zentren. In der Folge würden sich die Geschwindigkeitskonstanten erhöhen¹⁵⁹ ohne die Gleichgewichtsreaktion zu verschieben.

Die in Abbildung 4-1 beschriebenen Zustände des langsamen und schnellen Elektronentransfers scheinen bei der Verwendung von NH_4Cl zeitgleich vorzuliegen, was zum doppel-exponentiellen Charakter des Elektronentransfers führt. Bei der Verwendung von KCl wurden mono-exponentielle Elektronentransferreaktionen gemessen, was dafür spricht, dass bei den Messungen eines der beiden Intermediate besonders dominant vorliegt. Interessanterweise zeigt die Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten von der KCl -Konzentration einen sigmoidalen Verlauf, während die Geschwindigkeitskonstanten in Abhängigkeit von der NH_4Cl -Konzentration sich hyperbol beschreiben lassen. Die Gründe für diese unterschiedlichen Charakteristika, abhängig vom monovalenten Kation, könnten negative Kooperativität, ein pseudo-sigmoidaler Kurvenverlauf oder ein komplexerer Bindungsmechanismus sein^{160–163}. Für die nähere Bestimmung müssten jedoch weiterführende Experimente durchgeführt werden.

Der Einfluss der monovalenten Kationen wird auch in den Messungen des Elektronentransfers in Abhängigkeit von der ATP-Konzentration deutlich (Abb. 3-11). Mit 150 mM NH_4Cl konnte ein mehr als 10-fach kleinerer K_D -Wert ($0,32 \pm 0,01$ mM) bestimmt werden als mit 500 mM KCl ($K_D=4,03 \pm 0,13$ mM), was auch zu einer höheren katalytischen Effizienz bei 150 mM NH_4Cl führt. Bei der Verwendung von 500 mM KCl konnte jedoch mit $46,61 \pm 0,36 \text{ s}^{-1}$ ein leicht höherer k_{lim} bestimmt werden als mit 150 mM NH_4Cl ($k_{\text{lim}}=14,62 \pm 0,11 \text{ s}^{-1}$). Basierend auf kinetischen Modellannahmen (Abb. 4-1) sollte NH_4^+ stärker die Bindung von ATP und K^+ stärker das *conformational gating* unterstützen. Das steht im Einklang mit der Beobachtung, dass bei der Verwendung von NH_4^+ doppel-exponentielle Elektronentransferkinetiken gemessen werden konnten. Die stärkere Bindung von ATP und schwächere Unterstützung des *conformational gatings* könnten dazu führen, dass wie in Abbildung 4-1 beschrieben der langsame und schnellere Elektronentransfer zeitgleich gemessen werden können. Es ist zu erkennen, dass NH_4^+ eine höhere Affinität zu den Bindungsstellen besitzt als K^+ . K_D und k_{lim} mit 150 mM NH_4Cl + 500 mM KCl sind trotz des Überschusses an KCl vergleichbar zu den bestimmten K_D und k_{lim} mit 150 mM NH_4Cl . Des Weiteren kann dadurch ausgeschlossen werden, dass die unterschiedlichen kinetischen Konstanten rein auf die Ionenstärke zurückzuführen sind. In diesem Fall sollten die Messungen mit hoher Ionenstärke (150 mM NH_4Cl + 500 mM KCl ; 500 mM KCl) zu ähnlichen Werten führen. Die Ionenstärke zeigte zwar

einen Einfluss auf den k_{on} des Komplexes (Abb. 3-12), dieser scheint jedoch den Elektronentransfer nicht zu beeinflussen. Dabei lagen die bestimmten Raten im Bereich von vorhergehenden Messungen¹⁰⁵. Ein spezifischer Einfluss von K^+ oder NH_4^+ auf die Komplexassoziation konnte nicht bestimmt werden. Die k_{off} -Werte blieben in allen gemessenen Bedingungen weitgehend konstant. Auf Grund der hohen Standardabweichungen können diese jedoch Werte von $0 - 0,43 \text{ s}^{-1}$ annehmen und sind nicht sehr aussagekräftig. Da in der Elektronen-transferreaktion die Bindung von ATP die Interaktionen der Proteine beeinflussen kann und sich durch den Elektronentransfer die Interaktionen zwischen RACo und CoFeSP verringern⁷⁷, spielt dieser k_{off} im katalytischen Zyklus eine eher untergeordnete Rolle.

Die Auswirkungen verschiedener Ionen auf die spezifischen Aktivitäten und Interaktionen von Proteinen der ASKHA-Familie sind sehr unterschiedlich und können nur schwer verallgemeinert werden. Ein Grund hierfür könnte sein, dass sich die ASKHA-Domänen nicht nur sequenziell, sondern auch strukturell stark voneinander unterscheiden können^{37,164}. Aktin¹⁵⁵ und Hsp70¹⁴⁹ zeigen eine Erhöhung der spezifischen Aktivität durch K^+ . Auf das bakterielle Aktin-Homolog MreB¹⁶⁵ wirkt K^+ ebenfalls aktivierend, wohingegen Mg^{2+} inhibitorisch wirkt¹⁶⁶. Über die Glycerol-Kinase wird berichtet, dass sie ihre höchste Aktivität bei einer geringeren molaren Mg^{2+} -Konzentration als das zugegebene ATP besitzt¹³⁴ oder die Bindung von ATP unabhängig von Mg^{2+} erfolgt¹³⁵. Höhere Aktivitäten konnten mit $CoCl_2$, $ZnCl_2$ und $NiCl_2$ gemessen werden¹⁶⁷. NH_4^+ wirkt stimulierend auf die Hsp70 Aktivität¹³² und konnte auch in der ATP-Bindungstasche von ASKHA-Proteinstrukturen gefunden werden^{41,69}. Die größten kinetischen Übereinstimmungen bezüglich der aktivierenden Wirkung von K^+ und NH_4^+ weißt das *Activating Enzyme* der Vanillat-O-Demethylase auf⁹⁴. Eine tiefergehende kinetische Analyse steht zu diesem Enzym jedoch noch aus.

4.4 Eine Konformationsänderung nach der Nukleotid-Bindung ist der ratenlimitierende Schritt des Elektronentransfers

Es konnte gezeigt werden, dass der Elektronenübergang mit nicht-hydrolysierbaren ATP-Analoga und mit ADP induziert werden kann (Abb.3-13). Durch Analyse des Reaktionsansatzes mittels HPLC konnten keine Hydrolyse-Produkte nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis zusammen mit einem Elektronentransfer von $Co(I)FeSP$ auf $RACo^{ox}$ (Abb. 3-15B) und der Rate der ATP-Hydrolyse von $0,123 \pm 0,017 \text{ s}^{-1} - 0,163 \pm 0,012 \text{ s}^{-1}$ (Abb. 3-16) sind starke Indikatoren dafür, dass der Elektronentransfer durch die Bindung von ATP induziert wird und sich anschließend ein Gleichgewicht mit bidirektionalem Elektronentransfer ausbildet. Der ratenlimitierende Schritt, welcher in Abhängigkeit von der ATP-Konzentration gemessen werden konnte, ist demnach höchstwahrscheinlich eine Konformationsänderung nach der Bindung von ATP. Für diese Konformationsänderung scheint das γ -Phosphat des ATP nicht

essentiell zu sein, da auch mit ADP ein Elektronentransfer beobachtet werden konnte. Jedoch wurden im Vergleich zu ATP für die beiden getesteten Analoga und für ADP ein geringerer k_{obs} und weniger transferierte Elektronen pro CoFeSP gemessen. Um ein Elektron vom [2Fe2S]-Cluster von RACo auf das Kobalt von CoFeSP zu übertragen, muss ein ΔE von mehr als 260 mV überwunden werden¹⁰⁰. Durch diese Differenz sollte sich ohne gebundenes Nukleotid das Gleichgewicht weit auf der Seite des Komplexes Co(II)FeSP:RACo^{red} befinden. Untersuchungen eines verwandten RACE-Proteins haben gezeigt, dass sich durch die Zugabe von ATP die Redox-Potentiale der Redox-Zentren annähern¹⁶⁸. Die Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Annäherung der Redox-Potentiale von RACo und des Cobalamins von CoFeSP durch die Bindung von ATP und einer nachfolgenden Konformationsänderung ermöglicht wird. In dieser Konformation könnten sich die Redox-Potentiale z. B. durch die Änderung der Winkel oder Bindungslängen des Corrinrings¹⁶⁹, die Position des Elektrons im [2Fe2S]-Cluster¹⁷⁰ oder H-Bindungswechselwirkungen der beiden Redox-Zentren^{171,172} annähern. Angesichts des ΔE von mehr als 260 mV ist ein Zusammenspiel mehrerer Mechanismen aber am wahrscheinlichsten. Die getesteten ATP-Analoga und ADP könnten die Konformationsänderung nicht vollständig stabilisieren, was zu weniger transferierten Elektronen und kleineren Raten führen würde. Dadurch kann durch ADP-Bindung auch nur e_{max} von $0,27 \pm 0,01$ transferierten Elektronen je CoFeSP erreicht werden (Abb. 3-14). Das weist daraufhin, dass das γ -Phosphat zwar nicht essentiell für den Elektronentransfer ist, aber die ratenlimitierende Konformationsänderung unterstützt. NMR-Studien weisen darauf hin, dass Mg^{2+} in MgATP^{2-} überwiegend das β - und γ -Phosphat komplexiert¹⁷³. Die Kristallstrukturen von vielen ASKHA-Proteinen zeigen, dass sie ATP über diese Koordination binden^{38–40,174,175}. Die dadurch fehlenden Interaktionen mit ADP könnten die Ausbildung der für den Elektronentransfer günstigen Konformation beeinflussen. Auch die Phosphorsäure-esterbindung scheint die Interaktionen zu unterstützen, da auch mit 2 mM AMP-PCP weniger Elektronen transferiert werden und ein geringer k_{obs} ermittelt werden konnte. Ähnliches gilt für ATP γ S, dessen größerer Atomradius des Schwefels wahrscheinlich die Bindung des Moleküls sterisch behindert. Ähnliche Effekte konnten auch bei anderen ASKHA-Proteinen gezeigt werden^{146,176–178}. Bei den gemessenen Werten ist jedoch zu berücksichtigen, dass die höchste erhältliche Reinheit von ATP γ S bei mindestens 90 % und von AMP-PCP bei mindestens 95 % liegt. Die höchstkonzentrierte Verunreinigung ist laut Herstellerangaben ADP. Da auch ADP den Elektronentransfer induzieren kann, könnte die gemessene Kinetik in beiden Fällen davon beeinflusst worden sein.

Die Messungen der transferierten Elektronen in Abhängigkeit zur ADP-Konzentration ergaben ein e_{max} von $0,27 \pm 0,01$ transferierte Elektronen je CoFeSP und ein K von $0,9 \pm 0,11 \text{ mM}^{-1}$ (Abb. 3-14). Jedoch konnten schon bei 2 mM ADP mit 0,267 transferierte Elektronen je CoFeSP ein ähnlicher Wert gemessen werden (Abb. 3-13). Der Grund dafür könnte die

zunehmende Oxidation von Co(I)FeSP während der Messungen sein. Cobalamin kann im Co(I)-Zustand Wasser reduzieren¹⁷⁹ oder auch durch Spuren von Sauerstoff im anoxischen Handschuhkasten oxidiert werden. Beide Reaktionen würden mit zunehmender Dauer des Experiments Co(I)FeSP und Co(II)FeSP oxidieren. Da die Messungen der transferierten Elektronen in Abhängigkeit zur ADP-Konzentration mehr Zeit in Anspruch nahm als *stopped-flow*-Messungen, ist anzunehmen, dass während der Messung ein Teil von Co(I)FeSP zu Co(II)FeSP oxidiert wurde. Das könnte die verhältnismäßig große Standardabweichung von $\pm 0,11 \text{ mM}^{-1}$ bei einem K von $0,9 \text{ mM}^{-1}$ erklären.

4.5 Ausbildung eines bidirektionalen Elektronentransfers zwischen RACo und CoFeSP

Es konnte gezeigt werden, dass Co(I)FeSP durch 2 mM DTT im reduzierten Zustand gehalten werden kann (Abb. 3-15A). In diesem Zustand ist das Kobalt quadratisch-planar im Corrin-Ring koordiniert¹⁸⁰ und kann demzufolge nicht von einem DTT-Radikal koordiniert werden. Des Weiteren ist das Redox-Potential bei dem genutzten pH-Wert von 7,5 nicht negativ genug, um RACo zu reduzieren^{100,126}. Mit dieser Methode konnte erstmals ein „Rücktransfer“ des Elektrons von Co(I)FeSP auf RACo gezeigt werden. Diese Herangehensweise könnte auch für andere ATP-gekoppelte *uphill* Elektronentransfers interessant sein. Die Mechanismen anderer Proteine werden meist bei einer kontinuierlichen Reduktion des jeweiligen Reaktionspartners mit positiverem Redox-Potential gemessen. Das mehrheitlich genutzte Reduktionsmittel ist dabei Natriumdithionit^{25,62,69,94,141}. Natriumdithionit besitzt je nach Reaktionspartner und Bedingungen unterschiedliche Reduktionsraten^{181,182}. Dadurch lässt sich der Einfluss des Reduktionsmittels auf andere ATP-gekoppelte *uphill* Elektronentransferreaktionen nicht genau abschätzen. Dennoch bleibt eine kontinuierliche Reduktion des jeweiligen Reaktionspartners mit positiverem Redox-Potential, die einem reversiblen Elektronentransfer entgegenwirken könnte. Im Elektronentransfer zwischen RACo und CoFeSP konnte dieser Einfluss gezeigt werden.

In der Anwesenheit des Reduktionsmittels DTT, welches RACo kontinuierlich reduziert, erfolgt nach dem Elektronentransfer eine erneute Reduktion. Diese inhibiert den „Rücktransfer“ des Elektrons und verschiebt das Gleichgewicht in Richtung von Co(I)FeSP (Abb. 3-15B und Abb. 3-17B). Dabei entsprach die Rate der Reduktion von RACo in etwa der Rate des Elektronentransfers. Das lässt sich damit erklären, dass DTT ein Zwei-Elektronen-Donor ist. Nach der vollständigen Oxidation erfolgt ein Ringschluss, was die Abgabe der Elektronen thermodynamisch begünstigt. Nach der Abgabe eines Elektrons entsteht ein thermodynamisch ungünstiges Intermediat, sodass die Abgabe des zweiten Elektrons viel schneller verläuft¹⁸³. Das macht die erste Reduktion von RACo ratenlimitierend. Nach einer langsamen Reduktion des [2Fe2S]-Clusters erfolgen ein schneller Elektronentransfer und eine schnelle erneute

Reduktion des [2Fe2S]-Clusters. Im reduzierenden Milieu des Zytosols von *Carboxydotherrnus hydrogenoforrans*¹³⁸ könnte der „Rücktransfer“ durch eine erneute Reduktion von RACo verhindert werden. Durch diese Reaktionsfolge wäre ein zusätzlicher exergonischer Elektronentransfer an den endergonischen Elektronentransfer gekoppelt. Ein ähnlicher Mechanismus liegt der Elektronenbifurkation zu Grunde. Hier erfolgt jedoch die Aufspaltung eines Elektronenpaars¹⁸⁴. Die Änderung der Gibbs-Energie durch den exergonischen Elektronentransfer unterstützt die Bildung von Co(I)FeSP. In einer Gleichgewichtsreaktion gilt die Gibbs Energie als Gleichgewichtskriterium. Ist die Gibbs-Energie der Produkte kleiner als die Gibbs-Energie der Edukte läuft die Reaktion in Richtung der Produkte ab. Durch die erneute Reduktion von RACo nach dem Elektronentransfer verringert sich die Gibbs-Energie der Produkte gemäß der Nernst-Gleichung proportional zur Differenz der Redox-Potentiale. Dies begünstigt thermodynamisch die Bildung von Co(I)FeSP. Ein weiterer Schritt, welcher die Gibbs-Energie der Produkte herabsetzt, ist die ATP-Hydrolyse. Sie stellt höchstwahrscheinlich auch den irreversiblen Schritt in der Reaktionsfolge dar.

Für die mathematische Annäherung der ATP-Hydrolyse in Abhängigkeit von der Zeit wurde die Exponentialfunktion durch den Term k_{ss} erweitert (G13). Dieser beschreibt den *steady-state* in der Gleichgewichtsreaktion. Die *turnover number* von $0,027 \pm 0,001 \text{ s}^{-1} - 0,051 \pm 0,002 \text{ s}^{-1}$ lag im Bereich zuvor veröffentlichter Untersuchungen¹⁰⁰ von $0,041 \text{ s}^{-1}$. In den Reaktionsbedingungen von Hennig et al. wurden 150 mM KCl verwendet, wohingegen in den vorliegenden Untersuchungen 500 mM KCl verwendet wurden. Das deutet darauf hin, dass die ATP-Hydrolyse in diesem Konzentrationsbereich weitgehend unabhängig von der KCl-Konzentration ist. Diese Beobachtung ist ein weiteres Argument, dass sich Kalium-Ionenkonzentrationen in diesem Bereich überwiegend auf das *conformational gating* des Elektronentransfers auswirken. Es ist jedoch zu beachten, dass nach dem Elektronentransfer und der Komplex-Dissoziation auch RACo^{ox} gebildet wird, welches ebenfalls ATP hydrolysiert¹⁰⁰. Da RACo^{ox} jedoch ein Produkt der Elektronentransferreaktion ist, sollte die Geschwindigkeitskonstante k_{obs} des *presteady-state* davon weitestgehend unbeeinflusst bleiben. Diese war mit $0,123 \pm 0,017 \text{ s}^{-1} - 0,163 \pm 0,012 \text{ s}^{-1}$ signifikant geringer als der Elektronentransfer.

4.6 Komplex- und Phosphatdissoziation

Aktin bildet nach der ATP-Hydrolyse einen stabilen Komplex mit ADP und dem Orthophosphat aus¹³⁹. Für die Elektronentransferreaktion des Co(II)FeSP:RACo^{red}-Komplexes konnte für die Dissoziation des Orthophosphates eine limitierende Rate von $0,1 \pm 0,0027 \text{ s}^{-1}$ ermittelt werden (Abb. 3-19). Das entspricht in etwa den bestimmten Hydrolyseraten von $0,123 \pm 0,017 \text{ s}^{-1} - 0,163 \pm 0,012 \text{ s}^{-1}$. Dass ein stabiler Komplex mit dem Orthophosphat gebildet wird, ist

demnach unwahrscheinlich. Die Kristallstruktur von RACo enthält jedoch ein gebundenes Phosphat in der ASKHA-Domäne des Proteins⁷⁷. Der Grund hierfür könnte das durch die Hydrolyse entstehende ADP sein. Die beiden negativen Ladungen des Orthophosphates und des β -Phosphates des ADP könnten sich, nach dem Bruch der kovalenten Bindung durch die Hydrolyse, gegenseitig abstoßen. Ein weiterer Grund könnten auch die Reaktionsbedingungen sein. Um die Messungen durchführen zu können, musste mit phosphatfreiem Reaktionspuffer gearbeitet werden. Durch die Verwendung von MDCC-PBP im Überschuss zum erwarteten Phosphat wird zusätzlich das freiwerdende Phosphat gebunden. Einem möglichen Gleichgewicht würde demnach das Orthophosphat entzogen werden.

Für das ASKHA-Protein DnaK ist bekannt, dass sich der ratenlimitierende Schritt des Reaktionszyklus mit der Phosphatkonzentration des Reaktionspuffers ändert. In phosphatfreier Umgebung ist die Hydrolyse ratenlimitierend, während unter physiologischer Phosphatkonzentration die Dissoziation von ADP ratenlimitierend ist¹⁷⁶. Auch erhöhte ADP-Konzentrationen haben Auswirkungen auf den Reaktionszyklus von DnaK und verändern die Affinität zu ATP¹⁸⁵. Ähnliche Auswirkungen auf die Geschwindigkeitskonstanten der Elektronentransferreaktion zwischen RACo und CoFeSP können nicht ausgeschlossen werden.

In Abbildung 3-19A ist in den ersten Sekunden der Messung eine Abweichung der Fluoreszenz von der mathematischen Annäherung zu erkennen. Diese ist wahrscheinlich auf Phosphat-Verunreinigungen in der ATP-Lösung zurückzuführen. ATP wurde zwar vor den Messungen über eine Anionenaustauschchromatographie gereinigt, um freies Phosphat abzutrennen, jedoch zeigt ATP auch eine Autohydrolyse¹⁸⁶. Das heißt, dass ATP auch ohne Einwirkung von Enzymen in wässriger Lösung zu ADP und Orthophosphat zerfällt. In der Zeitspanne zwischen der Herstellung der ATP-Lösung und Messung entstehen auf diesem Weg Phosphatmoleküle, welche den stärkeren Anstieg der Fluoreszenz in der Anfangsphase der Messung begründen könnten.

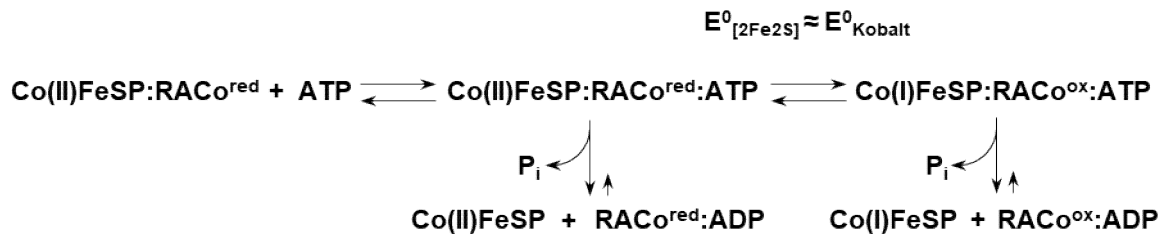
Durch den Elektronentransfer von reduziertem RACo auf Co(II)FeSP verringern sich die Interaktionen zwischen den Proteinen⁷⁷. Um dieses Ergebnis zu bestätigen und die kinetischen Konstanten zu bestimmen, wurde die Oxidation von Co(I)FeSP durch Zugabe von RACo^{ox} spektroskopisch verfolgt. Wie bereits erwähnt, kann Co⁺ im Cobalamin durch Reduktion von Wasser¹⁷⁹ oder Sauerstoffrückstände im anoxischen Handschuhkasten zu Co²⁺ oxidiert werden. Dadurch können geringe Mengen von Co(I)FeSP noch vor der Messung zu Co(II)FeSP oxidiert werden, wodurch die Konzentration von Co(I)FeSP in den Messungen variieren kann. Dieser Umstand sollte sich jedoch nur auf die Amplitude der Reaktion auswirken und nicht auf die Geschwindigkeitskonstante. Eine Auswertung und tiefergehende Interpretation der Amplitude war dadurch nicht möglich. Für den ATP-gekoppelten *uphill* Elektronentransfer ist eine Konformationsänderung als ratenlimitierender Schritt am

wahrscheinlichsten. Für den Elektronentransfer von Co(I)FeSP auf RACo^{ox} scheint dies, in dem gemessenen Konzentrationsbereich, nicht zuzutreffen. Die Geschwindigkeitskonstanten mit und ohne ADP in Abhängigkeit zur RACo^{ox}-Konzentration zeigen einen linearen Anstieg, welcher nicht durch den Koordinatenursprung verläuft. Dadurch ließen sich k_{on} und k_{off} der Proteine bestimmen. Der k_{on} der Proteine wird durch die Reduktion von Co(II)FeSP zu Co(I)FeSP in etwa 100-mal kleiner ($4,2 \pm 1,9 \times 10^{-2} \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ für Co(II)FeSP; $3,4 \pm 0,1 \times 10^{-4} \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ für Co(I)FeSP). Mit Hilfe des dazu ermittelten k_{off} von $6,6 \pm 0,5 \times 10^{-3} \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ konnte ein K_D von $19,4 \mu\text{M}$ berechnet werden. In früheren Studien wurde der K_D des Proteinkomplexes Co(II)FeSP:RACo^{ox} durch isotherme Titrationskalorimetrie mit $6,7 \text{ nM}^{100}$ und durch kinetische FRET-Spektroskopie mit $0,44 \mu\text{M}^{105}$ bestimmt. Bei dem Vergleich mit bereits publizierten Werten muss jedoch beachtet werden, dass die Messungen mit 500 mM KCl bei einer höheren Ionenstärke durchgeführt wurden und sich diese auf die Komplexassoziation auswirkt (Abb. 3-12). Aus den gemessenen Geschwindigkeitskonstanten kann dennoch geschlussfolgert werden, dass der Komplex Co(I)FeSP:RACo^{ox} bis zu einer Konzentration von ca. $20 \mu\text{M}$ überwiegend dissoziiert vorliegt. Bei der Zugabe von 10 mM ADP bleibt der k_{on} ($6,7 \pm 0,29 \times 10^{-4} \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) in etwa unverändert, während sich der k_{off} ($2,7 \pm 0,01 \times 10^{-1} \text{s}^{-1}$) um das 40-fache erhöht. Das könnte darauf hindeuten, dass nach der ATP-Hydrolyse und der P_i-Dissoziation der Proteinkomplex Co(I)FeSP:RACo^{ox/red}:ADP eine Konformation einnimmt, welche die Dissoziation des Komplexes begünstigt. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass die Bindung von ATP sich ähnlich auf die Interaktionen des Komplexes auswirkt oder diese sogar stärker destabilisiert. Da dadurch nicht eindeutig beantwortet werden kann, nach welchem Schritt der Proteinkomplex aus RACo und CoFeSP dissoziiert, sind drei Mechanismen (M1 – M3) für den ATP-gekoppelten *uphill* Elektronentransfer möglich. In allen Mechanismen muss beachtet werden, dass ohne eine kontinuierliche Reduktion von RACo nur etwa 0,5 Elektronen je CoFeSP übertragen werden.

4.7 Mögliche Reaktionsmechanismen des ATP-gekoppelten *uphill* Elektronentransfers zwischen RACo und CoFeSP

(M1) In diesem Mechanismus gleichen sich die Redox-Potentiale durch ATP-Bindung an und die ATP-Hydrolyse führt zur Dissoziation des Proteinkomplexes. Die Redox-Potentiale des [2Fe2S]-Clusters und des Kobalts nehmen durch die ATP-Bindung einen in etwa gleichen Wert an. Das ermöglicht den Elektronentransfer, lässt aber in gleichem Maß auch einen „Rücktransfer“ des Elektrons zu, sodass sich ein Gleichgewicht aus Co(II)FeSP:RACo^{red}:ATP und Co(I)FeSP:RACo^{ox}:ATP ausbildet. Auf Grund des gleichen Redox-Potentials liegen beide Zustände im Verhältnis 1:1 vor. Durch die ATP-Hydrolyse und vielleicht nachfolgender

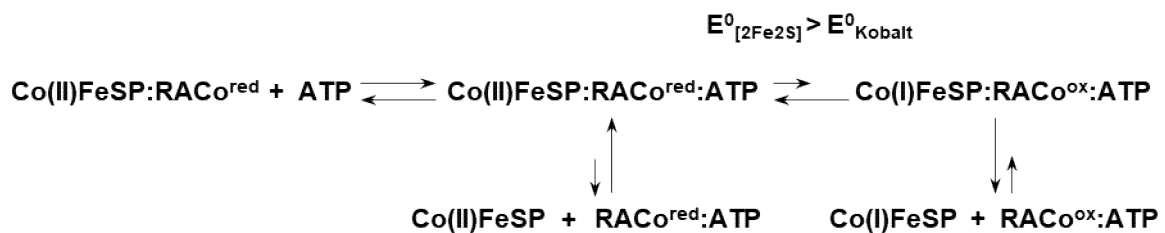
Mechanismen dissoziiert sowohl $\text{Co(II)FeSP:RACo}^{\text{red}}\text{:ATP}$ als auch $\text{Co(I)FeSP:RACo}^{\text{ox}}\text{:ATP}$ in gleichem Maße (RS 4-2). Dadurch werden 0,5 Elektronen pro CoFeSP übertragen.



Reaktionsschema 4-2. Möglicher Mechanismus des ATP-induzierten Elektronentransfers, in welchem die ATP-Hydrolyse mit gekoppelter P_i -Dissoziation den Proteinkomplex dissoziiert (M1).

Die Rate der ATP-Hydrolyse ist ca. 100-mal langsamer als der Elektronentransfer. Dieses Zeitfenster ermöglicht eine erneute Reduktion des $[2\text{Fe}2\text{S}]$ -Clusters, was zu der Ausbildung eines $\text{Co(I)FeSP:RACo}^{\text{red}}\text{:ATP}$ -Komplexes führt und den „Rücktransfer“ des Elektrons verhindert. Dadurch würde ein ATP pro Elektronentransfer benötigt werden. Zwei Beobachtungen stützen dieses Modell. Für die ATP-Hydrolyse und die Dissoziation von P_i konnten ähnliche Raten gemessen werden, was zu einem Komplex $\text{Co(I)FeSP:RACo}^{\text{red}}\text{:ADP}$ führen könnte. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sich durch ADP der k_{off} des Komplexes $\text{Co(I)FeSP:RACo}^{\text{ox}}$ deutlich erhöht. Der Redox-Zustand von RACo sollte die Interaktionen nicht stark beeinflussen, da für RACo mit und ohne Ferredoxin-Domäne ähnliche Dissoziationskonstanten ermittelt wurden¹⁰⁰. Dementsprechend sollte der k_{off} des Komplexes $\text{Co(I)FeSP:RACo}^{\text{red}}\text{:ADP}$ ähnlich hoch sein.

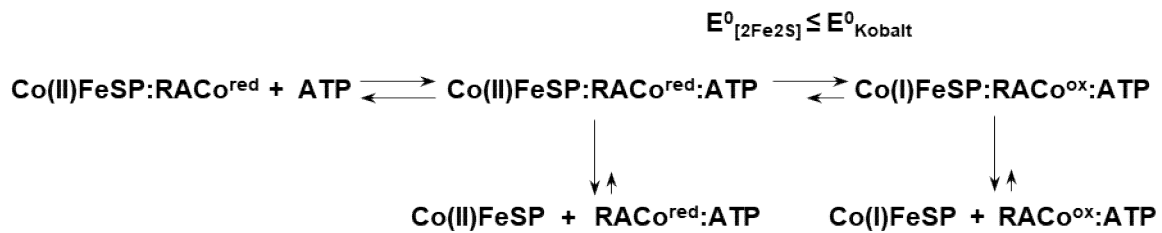
(M2) In diesem möglichen Mechanismus nähern sich die Redox-Potentiale durch die ATP-Bindung zwar an, erreichen aber nicht die gleichen Werte. Das Redox-Potential des Kobalts von CoFeSP bleibt etwas niedriger als das Redox-Potential von RACo. Das daraus entstehende Gleichgewicht liegt demzufolge auf der Seite des $\text{Co(II)FeSP:RACo}^{\text{red}}\text{:ATP}$. Im Gegensatz zum ersten Mechanismus destabilisiert die Bindung von ATP den Proteinkomplex. Da die Bildung von Co(I)FeSP den Proteinkomplex jedoch auch destabilisiert, dissoziiert $\text{Co(I)FeSP:RACo}^{\text{ox}}\text{:ATP}$ in größeren Anteilen als $\text{Co(II)FeSP:RACo}^{\text{red}}\text{:ATP}$. Dieser Umstand wirkt auf das Gleichgewicht in Richtung der Co(I)FeSP -Bildung, sodass ein Verhältnis von Co(II)FeSP zu Co(I)FeSP von 1:1 entsteht (RS 4-3). Auch in diesem Mechanismus würde eine Reduktion von RACo^{ox} zu $\text{Co(I)FeSP:RACo}^{\text{red}}\text{:ATP}$ oder $\text{RACo}^{\text{red}}\text{:ATP}$ den „Rücktransfer“ des Elektrons verhindern.



Reaktionsschema 4-3. Möglicher Mechanismus des ATP-induzierten Elektronentransfers mit Verschiebung des Gleichgewichtes durch Co(I)FeSP-Bildung (M2).

Für diesen Mechanismus spricht ebenfalls der erhöhte k_{off} von RACo^{ox} und Co(I)FeSP in Anwesenheit von ADP. Die Bindung des Nukleotids könnte den Komplex destabilisieren, was auch durch die Bindung von ATP erreicht werden würde. Die Aufgabe der ATP-Hydrolyse wäre RACo von einem Übergangszustand zurück in die Ausgangskonformation zu bringen, um erneut mit Co(II)FeSP interagieren zu können. Gegen diesem Mechanismus spricht, dass die Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation von $\text{Co(I)FeSP:RACo}^{\text{ox}}:\text{ATP}$ einen ähnlichen Wert wie der Elektronentransfer haben müsste, um das Gleichgewicht zu beeinflussen. Das heißt, der k_{off} des $\text{Co(I)FeSP:RACo}^{\text{ox}}:\text{ATP}$ -Komplexes müsste drei Größenordnungen größer sein als der k_{off} , welcher von Co(I)FeSP und RACo^{ox} in Anwesenheit von ADP gemessen wurde. Da sich ADP und ATP nur in einem Phosphatrest unterscheiden, ist dies unwahrscheinlich.

(M3) Im dritten möglichen Mechanismus dissoziiert der Proteinkomplex annähernd vollständig durch ATP-Bindung in der gleichen Rate wie der Elektronentransfer. Dadurch, dass Elektronentransfer und Dissoziation in den gleichen Raten erfolgen, können nur 0,5 Elektronen je CoFeSP übertragen werden. Um diesen Zustand aufrechtzuerhalten, müssten die Proteine nach der Bindung an ATP weitgehend dissoziiert bleiben. Die Bildung von Co(I)FeSP verringert jedoch die Interaktionen zwischen den beiden Proteinen. Damit sich ähnliche Konzentrationen von Co(II)FeSP und Co(I)FeSP im Gleichgewicht bilden können, muss demnach die ATP-Bindung den Proteinkomplex wesentlich stärker destabilisieren als die Bildung von Co(I)FeSP (RS 4-4). Da in diesem Mechanismus RACo und CoFeSP durch ATP-Bindung nahezu irreversibel voneinander dissoziieren, darf auch das Gleichgewicht des Elektronentransfers nicht auf der Seite des $\text{Co(II)FeSP:RACo}^{\text{red}}:\text{ATP}$ liegen. Andererseits würden weniger als 0,5 Elektronen je CoFeSP übertragen werden. Das Redox-Potential des $[2Fe2S]$ -Clusters von RACo muss dazu kleiner oder gleich dem Redox-Potential des Kobalts sein.



Reaktionsschema 4-4. Möglicher Mechanismus des ATP-induzierten Elektronentransfers mit vergleichbaren Raten des Elektronentransfers und der durch ATP-Bindung initiierten Komplexdissoziation (M3).

Dieser Mechanismus erfordert eine starke Veränderung der Redox-Potentiale beider Cofaktoren und eine unrealistische vollständige Dissoziation des Komplexes durch die ATP-Bindung. Des Weiteren wäre der Mechanismus ineffektiv, da nur 50 % des hydrolysierten ATP zur Bildung von Co(I)FeSP führen würden.

Mechanismus 1 ist (Reaktionsschema 4-2) am wahrscheinlichsten. Dieser Mechanismus steht im Einklang mit den gemessenen Daten und würde durch die Reduktion von Co(I)FeSP:RACo^{ox}:ATP zu einem hydrolysierten ATP je übertragenem Elektronen führen. Der schnelle Elektronentransfer mit anschließender langsameren ATP-Hydrolyse würde der Reduktion von RACo nach dem Elektronentransfer genügend Zeit einräumen. Die Kopplung dieses exergonischen Elektronentransfers an den ATP-gekoppelten endergonischen Elektronentransfer wäre zudem thermodynamisch von Vorteil. Das reduzierende Milieu des Zytosols von *Carboxydotherrnus hydrogenofomans* schafft die dazu nötigen Voraussetzungen. Abbildung 4-1 fasst den beschriebenen Mechanismus zusammen.

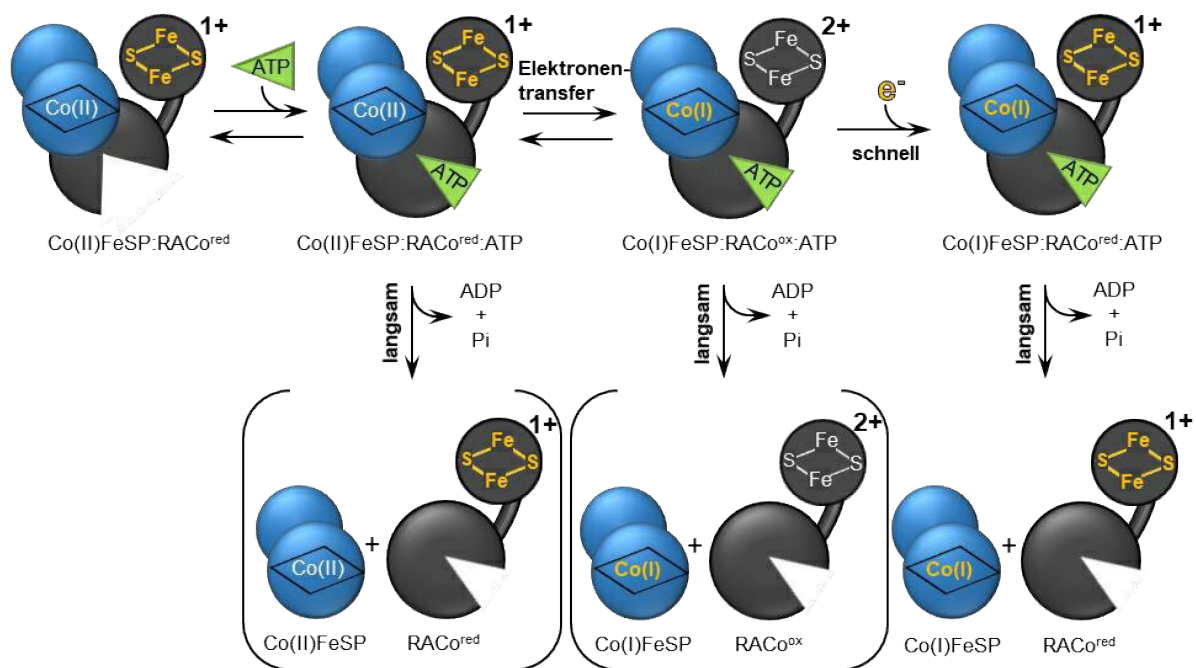


Abbildung 4-1. Vorgeschlagener Mechanismus des ATP-induzierten Elektronentransfers von RACo^{red} und Co(II)FeSP . RACo ist in Schwarz und CoFeSP in Blau dargestellt. Das $[\text{2Fe2S}]$ -Cluster von RACo und das Kobalt des Cobalamins sind in den reduzierten Zuständen gelb hervorgehoben. Im Proteinkomplex $\text{Co(II)FeSP:RACo}^{\text{red}}$ ist die ATP-Bindetasche von RACo geöffnet. Die ATP-Bindung schließt die Bindetasche und induziert Konformationsänderungen, wodurch sich die Redox-Potentiale annähern. Dadurch kommt es zu einem Gleichgewicht mit bidirektionalem Elektronentransfer, in welchem $\text{Co(II)FeSP:RACo}^{\text{red}}$ und $\text{Co(I)FeSP:RACo}^{\text{ox}}$ in gleichen Konzentrationen vorliegen. Eine weitere Reduktion erzeugt den Proteinkomplex $\text{Co(I)FeSP:RACo}^{\text{red}}$. Dadurch bleiben beide Redox-Zentren reduziert. Die ATP-Hydrolyse und die gekoppelte P_i -Dissoziation induzieren die Dissoziation des Proteinkomplexes und stellen außerdem den irreversiblen Schritt des Reaktionsmechanismus dar. Die langsame ATP-Hydrolyse und die schnelle Reduktion von $\text{Co(I)FeSP:RACo}^{\text{ox}}$ stellen sicher, dass sich beide Redox-Zentren zum Zeitpunkt der Dissoziation in einem reduzierten Zustand befinden.

Der vorgeschlagene Mechanismus stellt eine neue Variante des ATP-gekoppelten *uphill* Elektronentransfers dar. Er nutzt einen zusätzlichen exergonischen Elektronentransfer, um den „Rücktransfer“ des Elektrons zu vermeiden. Dabei induziert die ATP-Bindung den Elektronentransfer ähnlich der Nitrogenase und dem Aktivator der (R)-2-Hydroxyacyl-CoA-Dehydratasen. Bei der Nitrogenase verhindert jedoch eine Abfolge von Konformationsänderungen den „Rücktransfer“ des Elektrons¹⁴⁸. Der Mechanismus des Elektronentransfers des Aktivators der (R)-2-Hydroxyacyl-CoA-Dehydratasen ist hingegen nicht im Detail geklärt. Dass der *uphill* Elektronentransfer, ähnlich der ATP-abhängigen Benzoyl-CoA-Reduktasen oder MAP, durch die Phosphorylierung von RACo ermöglicht wird, kann auch ausgeschlossen werden, da der Elektronentransfer unabhängig von der ATP-Hydrolyse erfolgt. Die Dissoziation des Proteinkomplexes wäre jedoch ähnlich zum Mechanismus der Nitrogenase

und von Aktin. In beiden Fällen führt erst die Dissoziation des Phosphatrestes zu einer Änderung der Protein-Protein-Interaktionen und zu einer Dissoziation des jeweiligen Proteinkomplexes^{25,139}. Eine Geschwindigkeitskonstante für die Komplexdissoziation konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht bestimmt werden, um diese Annahme zu bestätigen. RACo weicht in seinen Eigenschaften sogar von anderen RACE-Proteinen ab. Diese wurden durch hohe ATP-Konzentrationen inhibiert und der Elektronentransfer konnte nicht durch ADP induziert werden^{75,94}.

Die Grundlage für die Charakterisierung des Elektronentransfers von RACo und CoFeSP war das Umgehen der kontinuierlichen Reduktion von RACo durch DTT während der Messungen. Die Reduktion eines Reaktionspartners durch ein starkes Reduktionsmittel und die Aufrechterhaltung des reduzierten Zustandes durch ein schwächeres Reduktionsmittel könnten auch eine tiefergehende Analyse anderer Elektronentransportprozesse ermöglichen, aber auch neue Anwendungsgebiete erschließen. Corrinoid-Proteine können z. B. Schutzgruppen bei chemischen Synthesen entfernen⁸⁷ oder toxische Halogenaromaten dehalogenieren¹⁸⁷. Die Kombination aus ATP, RACE-Protein und die Entfernung des starken Reduktionsmittels könnten die Reaktionen bei sehr milden Bedingungen erlauben.

5 Ausblick

Durch die vorliegende Arbeit konnte der Mechanismus des ATP-gekoppelten *uphill* Elektronentransfers zwischen RACo und CoFeSP besser verstanden werden. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse können weiterführende Experimente zu einem noch umfassenderen Bild des Mechanismus beitragen.

Es konnte gezeigt werden, dass K^+ als auch NH_4^+ einen starken Einfluss auf den Elektronentransfer haben. Da der Mechanismus vorwiegend bei 500 mM KCl untersucht wurde, könnten die Messungen zur ATP-Hydrolyse und Phosphatdissoziation bei 150 mM NH_4Cl weitere Aufschlüsse über die Rolle der Ionen während des Elektronentransfers geben. Des Weiteren legen die Untersuchungen nahe, dass K^+ und NH_4^+ das *conformational gating* des Elektrons unterstützen, indem beide Ionen den mittleren Abstand der Redox-Zentren verringern. Das könnte über Förster-Resonanzenergietransfer näher untersucht werden. Dazu müssten ein Donor-Farbstoff und ein Akzeptor-Farbstoff in die Nähe der beiden Redox-Zentren angebracht werden. Anschließend könnte eine Änderung des Abstandes bei ATP- oder ADP-Zugabe bei verschiedenen Konzentrationen von K^+ oder NH_4^+ gemessen werden. Um den vorgeschlagenen Mechanismus (M1) zu bestätigen, müssten die Auswirkungen der ATP-Bindung und -Hydrolyse auf die Komplexdissoziation eingehender untersucht werden. Nach Yang et al. befindet sich in ASKHA-Proteinen am Anfang der dritten α -Helix eine konservierte Asparagin- oder Glutaminsäure, welche als Base für die Hydrolyse wirkt³⁷. Der Austausch dieser Aminosäure könnte eine RACo-Variante schaffen, welche ATP weithin binden, jedoch nicht mehr hydrolysieren kann. Zur Bestätigung des Mechanismus sollte mit dieser RACo-Variante ein Elektronentransfer aber keine vollständige Komplexdissoziation messbar sein. Um die Dissoziation des Komplexes zu untersuchen, könnte z. B. eine analytische Größenausschlusschromatographie durchgeführt werden. Da die Komplexbildung über die Änderung der Tryptophan-Fluoreszenz verfolgt werden konnte, könnte auch versucht werden, die Dissoziation des Komplexes über diesen Ansatz zu messen. Mit dieser RACo-Variante könnte es auch möglich sein, den Proteinkomplex aus RACo und CoFeSP mit gebundenem ATP zu kristallisieren. Diese Proteinstruktur würde weitere Einblicke in ATP-induzierte Konformationsänderungen geben.

Ein weiterer Ansatz, um den vorgeschlagenen Mechanismus zu bestätigen wäre die Bestimmung der Redox-Potentiale des $[2Fe2S]$ -Clusters von RACo und des $Co^{+/2+}$ des Cobalamins in Anwesenheit von ATP. Damit $Co(II)FeSP:RACo^{red}:ATP$ und $Co(I)FeSP:RACo^{ox}:ATP$ im Verhältnis 1:1 vorliegen, müssten die Redox-Potentiale beider Redox-Zentren in etwa gleich sein. Um das Redox-Potential von CoFeSP in diesem Intermediat zu bestimmen, könnte eine RACo-Variante ohne Ferredoxin-Domäne verwendet werden. Dadurch sollten die Interaktionen beider Proteine nicht stark beeinflusst werden¹⁰⁰, aber ein Elektronentransfer des $[2Fe2S]$ -Clusters wäre nicht möglich.

In der Kristallstruktur von RACo befindet sich ein gebundenes Phosphat in der ATP-Bindungstasche⁷⁷. Die Messungen dieser Arbeit zeigten jedoch vergleichbare Raten für die ATP-Hydrolyse und die Phosphat-Dissoziation. Für das ASKHA-Protein DnaK konnte gezeigt werden, dass der ratenlimitierende Schritt des Proteins bei verschiedenen Phosphatkonzentration variiert und sich die Affinität zu ADP erhöht¹⁷⁶. Um einen ähnlichen Effekt der Phosphatkonzentration auf den Elektronentransfer von RACo und CoFeSP zu untersuchen, könnte der K_D für ADP bei variierenden Phosphatkonzentrationen bestimmt werden.

6 Literatur

1. Holtmann, D. & Harnisch, F. Die Bioelektrosynthese als essentieller Baustein der Bioökonomie (2019).
2. Harnisch, F. & Holtmann, D. Electrification of Biotechnology: Status quo. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **167**, 1–14; 10.1007/10_2017_41 (2019).
3. Mitchell, P. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **41**, 445–502; 10.1111/j.1469-185x.1966.tb01501.x (1966).
4. Gordiichuk, P. I., Wetzelaer, G. A. H., Rimmerman, D., Gruszka, A., Vries, J. W., Saller, M., Gautier, D. A., Catarci, S., Pesce, D., Richter, S., Blom, P. W. M., Herrmann, A. Solid-state biophotovoltaic cells containing photosystem I. *Adv. Mater. Weinheim.* **26**, 4863–4869; 10.1002/adma.201401135 (2014).
5. Elbehti, A., Brasseur, G. & Lemesle-Meunier, D. First evidence for existence of an uphill electron transfer through the bc(1) and NADH-Q oxidoreductase complexes of the acidophilic obligate chemolithotrophic ferrous ion-oxidizing bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **182**, 3602–3606; 10.1128/JB.182.12.3602-3606.2000 (2000).
6. Rebelein, J. G., Stiebritz, M. T., Lee, C. C. & Hu, Y. Activation and reduction of carbon dioxide by nitrogenase iron proteins. *Nat. Chem. Biol.* **13**, 147–149; 10.1038/nchembio.2245 (2017).
7. Lee, C. C., Hu, Y. & Ribbe, M. W. Vanadium nitrogenase reduces CO. *Science (New York, N.Y.)* **329**, 642; 10.1126/science.1191455 (2010).
8. Dobbek, H. Nitrogenase: A fuel-producing microbe. *Nat. Chem. Biol.* **13**, 134–135; 10.1038/nchembio.2288 (2017).
9. Eberlein, C., Johannes, J., Mouttaki, H., Sadeghi, M., Golding, B., ATP-dependent/-independent enzymatic ring reductions involved in the anaerobic catabolism of naphthalene. *Environ. Microbiol.* **15**, 1832–1841; 10.1111/1462-2920.12076 (2013).
10. DiDonato, Raymond J., Young, N. D., Butler, J. E., Chin, K., Hixson, K. K., Mouser, P., Lipton, Mary S.; DeBoy, R., Methé, B. A. Genome sequence of the deltaproteobacterial strain NaphS2 and analysis of differential gene expression during anaerobic growth on naphthalene. *PloS one* **5**, e14072; 10.1371/journal.pone.0014072 (2010).
11. Geiger, R. A., Junghare, M., Mergelsberg, M., Ebenau-Jehle, C., Jesenofsky, V. J., Jehmlich, N., Bergen, M., Schink, B., Boll, M. Enzymes involved in phthalate degradation in sulphate-reducing bacteria. *Environ. Microbiol.* **21**, 3601–3612; 10.1111/1462-2920.14681 (2019).
12. Ledbetter, R. N., Garcia Costas, A. M., Lubner, C. E., Mulder, D. W., Tokmina-Lukaszewska, M., Artz, J. H., Patterson, A., Magnuson, T. S., Jay, Z. J., Duan, H. D., Miller, J., Plunkett, M. H., Hoben, J. P.; Barney, B. M., Carlson, R. P., Miller, A., Bothner, B., King, P. W., Peters, J. W., Seefeldt, L. C. The Electron Bifurcating FixABCX Protein Complex from *Azotobacter vinelandii*: Generation of Low-Potential Reducing Equivalents for Nitrogenase Catalysis. *Biochemistry* **56**, 4177–4190; 10.1021/acs.biochem.7b00389 (2017).
13. Huang, H., Wang, S., Moll, J. & Thauer, R. K. Electron bifurcation involved in the energy metabolism of the acetogenic bacterium *Moorella thermoacetica* growing on glucose or H₂ plus CO₂. *J. Bacteriol.* **194**, 3689–3699; 10.1128/JB.00385-12 (2012).
14. Schut, G. J. & Adams, M. W. W. The iron-hydrogenase of *Thermotoga maritima* utilizes ferredoxin and NADH synergistically: a new perspective on anaerobic hydrogen production. *J. Bacteriol.* **191**, 4451–4457; 10.1128/JB.01582-08 (2009).
15. Brandt, U. Energy conservation by bifurcated electron-transfer in the cytochrome-bc1 complex. *Biochim. Biophys. Acta.* **1275**, 41–46; 10.1016/0005-2728(96)00048-5 (1996).
16. Mitchell, P. Possible molecular mechanisms of the protonmotive function of cytochrome systems. *J. Theor. Biol.* **62**, 327–367; 10.1016/0022-5193(76)90124-7 (1976).

17. Crofts, A. R. *et al.* The Q-Cycle Mechanism of the bc₁ Complex: A Biologist's Perspective on Atomistic Studies. *J. Phys. Chem. B.* **121**, 3701–3717; 10.1021/acs.jpcc.6b10524 (2017).
18. Osyczka, A., Moser, C. C., Daldal, F. & Dutton, P. L. Reversible redox energy coupling in electron transfer chains. *Nature* **427**, 607–612; 10.1038/nature02242 (2004).
19. Osyczka, A., Moser, C. C. & Dutton, P. L. Fixing the Q cycle. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 176–182; 10.1016/j.tibs.2005.02.001 (2005).
20. Burgess, B. K. & Lowe, D. J. Mechanism of Molybdenum Nitrogenase. *Chem. Rev.* **96**, 2983–3012; 10.1021/cr950055x (1996).
21. Bulen, W. A. & LeComte, J. R. The nitrogenase system from *Azotobacter*: two-enzyme requirement for N₂ reduction, ATP-dependent H₂ evolution, and ATP hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **56**, 979–986; 10.1073/pnas.56.3.979 (1966).
22. Kurnikov, I. V., Charnley, A. K. & Beratan, D. N. From ATP to Electron Transfer: Electrostatics and Free-Energy Transduction in Nitrogenase. *J. Phys. Chem. B* **105**, 5359–5367; 10.1021/jp002540o (2001).
23. Georgiadis, M. M. *et al.* Crystallographic structure of the nitrogenase iron protein from *Azotobacter vinelandii*. *Science (New York, N.Y.)* **257**, 1653–1659; 10.1126/science.1529353 (1992).
24. Chan, M. K., Kim, J. & Rees, D. C. The nitrogenase FeMo-cofactor and P-cluster pair: 2.2 Å resolution structures. *Science (New York, N.Y.)* **260**, 792–794; 10.1126/science.8484118 (1993).
25. Yang, Z.-Y. *et al.* Evidence That the P_i release event is the rate-limiting step in the nitrogenase catalytic cycle. *Biochemistry* **55**, 3625–3635; 10.1021/acs.biochem.6b00421 (2016).
26. Tezcan, F. A., Kaiser, J. T., Howard, J. B. & Rees, D. C. Structural evidence for asymmetrical nucleotide interactions in nitrogenase. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 146–149; 10.1021/ja511945e (2015).
27. Gu, W. & Milton, R. D. Natural and engineered electron transfer of nitrogenase. *Chemistry* **2**, 322–346; 10.3390/chemistry2020021 (2020).
28. Danyal, K., Mayweather, D., Dean, D. R., Seefeldt, L. C. & Hoffman, B. M. Conformational gating of electron transfer from the nitrogenase Fe protein to MoFe protein. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 6894–6895; 10.1021/ja101737f (2010).
29. Tezcan, F. A. *et al.* Nitrogenase complexes: multiple docking sites for a nucleotide switch protein. *Science (New York, N.Y.)* **309**, 1377–1380; 10.1126/science.1115653 (2005).
30. Schindelin, H., Kisker, C., Schlessman, J. L., Howard, J. B. & Rees, D. C. Structure of ADP x AIF₄(-)-stabilized nitrogenase complex and its implications for signal transduction. *Nature* **387**, 370–376; 10.1038/387370a0 (1997).
31. Ryle, M. J. & Seefeldt, L. C. Elucidation of a MgATP signal transduction pathway in the nitrogenase iron protein: formation of a conformation resembling the MgATP-bound state by protein engineering. *Biochemistry* **35**, 4766–4775; 10.1021/bi960026w (1996).
32. Lanzilotta, W. N. & Seefeldt, L. C. Changes in the midpoint potentials of the nitrogenase metal centers as a result of iron protein-molybdenum-iron protein complex formation. *Biochemistry* **36**, 12976–12983; 10.1021/bi9715371 (1997).
33. Danyal, K., Dean, D. R., Hoffman, B. M. & Seefeldt, L. C. Electron transfer within nitrogenase: evidence for a deficit-spending mechanism. *Biochemistry* **50**, 9255–9263; 10.1021/bi201003a (2011).
34. Seefeldt, L. C. *et al.* Energy transduction in nitrogenase. *Acc. Chem. Res.* **51**, 2179–2186; 10.1021/acs.accounts.8b00112 (2018).
35. Jeoung, J.-H. & Dobbek, H. ATP-dependent substrate reduction at an Fe₈S₉ double-cubane cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **115**, 2994–2999; 10.1073/pnas.1720489115 (2018).

36. Jeoung, J.-H., Martins, B. M. & Dobbek, H. Double-Cubane 8Fe9S Clusters: A novel nitrogenase-related cofactor in biology. *Chembiochem.* **21**, 1710–1716; 10.1002/cbic.202000016 (2020).
37. Yang, K. *et al.* Crystal structure of a type III pantothenate kinase: insight into the mechanism of an essential coenzyme A biosynthetic enzyme universally distributed in bacteria. *J. Bacteriol.* **188**, 5532–5540; 10.1128/JB.00469-06 (2006).
38. Petit, P. *et al.* The active conformation of human glucokinase is not altered by allosteric activators. *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **67**, 929–935; 10.1107/S0907444911036729 (2011).
39. Kityk, R., Kopp, J. & Mayer, M. P. Molecular mechanism of J-domain-triggered ATP hydrolysis by Hsp70 chaperones. *Mol. Cell.* **69**, 227–237.e4; 10.1016/j.molcel.2017.12.003 (2018).
40. Bystrom, C. E., Pettigrew, D. W., Branchaud, B. P., O'Brien, P. & Remington, S. J. Crystal structures of *Escherichia coli* glycerol kinase variant S58W in complex with nonhydrolyzable ATP analogues reveal a putative active conformation of the enzyme as a result of domain motion. *Biochemistry* **38**, 3508–3518; 10.1021/bi982460z (1999).
41. Gorrell, A., Lawrence, S. H. & Ferry, J. G. Structural and kinetic analyses of arginine residues in the active site of the acetate kinase from *Methanosarcina thermophila*. *J. Biol. Chem.* **280**, 10731–10742; 10.1074/jbc.M412118200 (2005).
42. Nishimasu, H., Fushinobu, S., Shoun, H. & Wakagi, T. Crystal structures of an ATP-dependent hexokinase with broad substrate specificity from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus tokodaii*. *J. Biol. Chem.* **282**, 9923–9931; 10.1074/jbc.M610678200 (2007).
43. Qi, R. *et al.* Allosteric opening of the polypeptide-binding site when an Hsp70 binds ATP. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 900–907; 10.1038/nsmb.2583 (2013).
44. Rould, M. A., Wan, Q., Joel, P. B., Lowey, S. & Trybus, K. M. Crystal structures of expressed non-polymerizable monomeric actin in the ADP and ATP states. *J. Biol. Chem.* **281**, 31909–31919; 10.1074/jbc.M601973200 (2006).
45. Kushkevych, I. V. Acetate kinase activity and kinetic properties of the enzyme in *Desulfovibrio piger* Vib-7 and *Desulfomicrobium sp.* Rod-9 intestinal bacterial strains. *Open. Microbiol. J.* **8**, 138–143; 10.2174/1874285801408010138 (2014).
46. Jordan, R. & McMacken, R. Modulation of the ATPase activity of the molecular chaperone DnaK by peptides and the DnaJ and GrpE heat shock proteins. *J. Biol. Chem.* **270**, 4563–4569; 10.1074/jbc.270.9.4563 (1995).
47. Flynn, G. C., Chappell, T. G. & Rothman, J. E. Peptide binding and release by proteins implicated as catalysts of protein assembly. *Science (New York, N.Y.)* **245**, 385–390; 10.1126/science.2756425 (1989).
48. Greene, L. E., Zinner, R., Naficy, S. & Eisenberg, E. Effect of nucleotide on the binding of peptides to 70-kDa heat shock protein. *J. Biol. Chem.* **270**, 2967–2973; 10.1074/jbc.270.7.2967 (1995).
49. Garner, E. C., Campbell, C. S. & Mullins, R. D. Dynamic instability in a DNA-segregating prokaryotic actin homolog. *Science (New York, N.Y.)* **306**, 1021–1025; 10.1126/science.1101313 (2004).
50. Ozyamak, E., Kollman, J., Agard, D. A. & Komeili, A. The bacterial actin MamK: in vitro assembly behavior and filament architecture. *J. Biol. Chem.* **288**, 4265–4277; 10.1074/jbc.M112.417030 (2013).
51. van den Ent, F., Izoré, T., Bharat, T. am, Johnson, C. M. & Löwe, J. Bacterial actin MreB forms antiparallel double filaments. *eLife* **3**, e02634; 10.7554/eLife.02634 (2014).
52. Straub, F. B. & Feuer, G. Adenosinetriphosphate the functional group of actin. *Biochim. Biophys. Acta.* **4**, 455–470; 10.1016/0006-3002(50)90052-7 (1950).

53. Boll, M., Einsle, O., Ermiler, U., Kroneck, P. M. H. & Ullmann, G. M. Structure and function of the unusual tungsten enzymes acetylene hydratase and class II Benzoyl-Coenzyme A reductase. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 119–137; 10.1159/000440805 (2016).
54. Boll, M., Albracht, S. S. & Fuchs, G. Benzoyl-CoA reductase (dearomatizing), a key enzyme of anaerobic aromatic metabolism. A study of adenosinetriphosphatase activity, ATP stoichiometry of the reaction and EPR properties of the enzyme. *Eur. J. Biochem.* **244**, 840–851; 10.1111/j.1432-1033.1997.00840.x (1997).
55. Boll, M. & Fuchs, G. Benzoyl-coenzyme A reductase (dearomatizing), a key enzyme of anaerobic aromatic metabolism. ATP dependence of the reaction, purification and some properties of the enzyme from *Thauera aromatica* strain K172. *Eur. J. Biochem.* **234**, 921–933; 10.1111/j.1432-1033.1995.921_a.x (1995).
56. Möbitz, H. & Boll, M. A Birch-like mechanism in enzymatic benzoyl-CoA reduction: a kinetic study of substrate analogues combined with an ab initio model. *Biochemistry* **41**, 1752–1758; 10.1021/bi0113770 (2002).
57. Kung, J. W. *et al.* Reversible biological Birch reduction at an extremely low redox potential. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 9850–9856; 10.1021/ja103448u (2010).
58. Boll, M. *et al.* Nonaromatic products from anoxic conversion of benzoyl-CoA with benzoyl-CoA reductase and cyclohexa-1,5-diene-1-carbonyl-CoA hydratase. *J. Biol. Chem.* **275**, 21889–21895; 10.1074/jbc.M001833200 (2000).
59. Dörner, E. & Boll, M. Properties of 2-oxoglutarate:ferredoxin oxidoreductase from *Thauera aromatica* and its role in enzymatic reduction of the aromatic ring. *J. Bacteriol.* **184**, 3975–3983; 10.1128/JB.184.14.3975-3983.2002 (2002).
60. Boll, M. Key enzymes in the anaerobic aromatic metabolism catalysing Birch-like reductions. *Biochim. Biophys. Acta.* **1707**, 34–50; 10.1016/j.bbabbio.2004.01.009 (2005).
61. Rabus, R., Boll, M., Golding, B. & Wilkes, H. Anaerobic degradation of p-alkylated benzoates and toluenes. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 63–75; 10.1159/000441144 (2016).
62. Möbitz, H., Friedrich, T. & Boll, M. Substrate binding and reduction of benzoyl-CoA reductase: evidence for nucleotide-dependent conformational changes. *Biochemistry* **43**, 1376–1385; 10.1021/bi0358871 (2004).
63. Unciuleac, M. & Boll, M. Mechanism of ATP-driven electron transfer catalyzed by the benzene ring-reducing enzyme benzoyl-CoA reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 13619–13624; 10.1073/pnas.241375598 (2001).
64. Kim, J., Hetzel, M., Boiangiu, C. D. & Buckel, W. Dehydration of (R)-2-hydroxyacyl-CoA to enoyl-CoA in the fermentation of alpha-amino acids by anaerobic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**, 455–468; 10.1016/j.femsre.2004.03.001 (2004).
65. Bahnson, B. J., Anderson, V. E. & Petsko, G. A. Structural mechanism of enoyl-CoA hydratase: three atoms from a single water are added in either an E1cb stepwise or concerted fashion. *Biochemistry* **41**, 2621–2629; 10.1021/bi015844p (2002).
66. Knauer, S. H., Buckel, W. & Dobbek, H. Structural basis for reductive radical formation and electron recycling in (R)-2-hydroxyisocaproyl-CoA dehydratase. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 4342–4347; 10.1021/ja1076537 (2011).
67. Kim, J., Darley, D. & Buckel, W. 2-Hydroxyisocaproyl-CoA dehydratase and its activator from *Clostridium difficile*. *FEBS J.* **272**, 550–561; 10.1111/j.1742-4658.2004.04498.x (2005).
68. Locher, K. P. *et al.* Crystal structure of the *Acidaminococcus fermentans* 2-hydroxyglutaryl-CoA dehydratase component A. *J. Mol. Biol.* **307**, 297–308; 10.1006/jmbi.2000.4496 (2001).
69. Knauer, S. H., Buckel, W. & Dobbek, H. On the ATP-dependent activation of the radical enzyme (R)-2-hydroxyisocaproyl-CoA dehydratase. *Biochemistry* **51**, 6609–6622; 10.1021/bi300571z (2012).

70. Hans, M. *et al.* Adenosine triphosphate-induced electron transfer in 2-hydroxyglutaryl-CoA dehydratase from *Acidaminococcus fermentans*. *Biochemistry* **41**, 5873–5882; 10.1021/bi020033m (2002).
71. Kim, J., Pierik, A. J. & Buckel, W. A complex of 2-hydroxyisocaproyl-coenzyme A dehydratase and its activator from *Clostridium difficile* stabilized by aluminium tetrafluoride-adenosine diphosphate. *Chemphyschem.* **11**, 1307–1312; 10.1002/cphc.200900876 (2010).
72. Daas, P. J., Gerrits, K. A., Keltjens, J. T., van der Drift, C. & Vogels, G. D. Involvement of an activation protein in the methanol:2-mercaptoethanesulfonic acid methyltransferase reaction in *Methanosarcina barkeri*. *J. Bacteriol.* **175**, 1278–1283; 10.1128/jb.175.5.1278-1283.1993 (1993).
73. Ferguson, T., Soares, J. A., Lienard, T., Gottschalk, G. & Krzycki, J. A. RamA, a protein required for reductive activation of corrinoid-dependent methylamine methyltransferase reactions in methanogenic archaea. *J. Biol. Chem.* **284**, 2285–2295; 10.1074/jbc.M807392200 (2009).
74. Chen, J.-X. *et al.* Cloning, expression, and characterization of a four-component O-demethylase from human intestinal bacterium *Eubacterium limosum* ZL-II. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 9111–9124; 10.1007/s00253-016-7626-1 (2016).
75. Siebert, A., Schubert, T., Engelmann, T., Studenik, S. & Diekert, G. Veratrol-O-demethylase of *Acetobacterium dehalogenans*: ATP-dependent reduction of the corrinoid protein. *Arch. Microbiol.* **183**, 378–384; 10.1007/s00203-005-0001-8 (2005).
76. Studenik, S., Vogel, M. & Diekert, G. Characterization of an O-demethylase of *Desulfitobacterium hafniense* DCB-2. *J. Bacteriol.* **194**, 3317–3326; 10.1128/JB.00146-12 (2012).
77. Hennig, S. E., Jeoung, J.-H., Goetzel, S. & Dobbek, H. Redox-dependent complex formation by an ATP-dependent activator of the corrinoid/iron-sulfur protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 5235–5240; 10.1073/pnas.1117126109 (2012).
78. van der Meijden, P., te Brömmelstroet, B. W., Poirot, C. M., van der Drift, C. & Vogels, G. D. Purification and properties of methanol:5-hydroxybenzimidazolylcobamide methyltransferase from *Methanosarcina barkeri*. *J. Bacteriol.* **160**, 629–635 (1984).
79. Menon, S. & Ragsdale, S. W. The role of an iron-sulfur cluster in an enzymatic methylation reaction. Methylation of CO dehydrogenase/acetyl-CoA synthase by the methylated corrinoid iron-sulfur protein. *J. Biol. Chem.* **274**, 11513–11518; 10.1074/jbc.274.17.11513 (1999).
80. van der Meijden, P. *et al.* Methyltransferases involved in methanol conversion by *Methanosarcina barkeri*. *Arch. Microbiol.* **134**, 238–242; 10.1007/BF00407765 (1983).
81. Kaufmann, F., Wohlfarth, G. & Diekert, G. O-demethylase from *Acetobacterium dehalogenans*-substrate specificity and function of the participating proteins. *Eur. J. Biochem.* **253**, 706–711; 10.1046/j.1432-1327.1998.2530706.x (1998).
82. Maynard, E. L. & Lindahl, P. A. Catalytic coupling of the active sites in acetyl-CoA synthase, a bifunctional CO-channeling enzyme. *Biochemistry* **40**, 13262–13267; 10.1021/bi015604+ (2001).
83. van der Meijden, P. *et al.* Activation and inactivation of methanol: 2-mercaptoethanesulfonic acid methyltransferase from *Methanosarcina barkeri*. *J. Bacteriol.* **153**, 6–11; 10.1128/JB.153.1.6-11.1983 (1983).
84. Goetzel, S., Jeoung, J.-H., Hennig, S. E. & Dobbek, H. Structural basis for electron and methyl-group transfer in a methyltransferase system operating in the reductive acetyl-CoA pathway. *J. Mol. Biol.* **411**, 96–109; 10.1016/j.jmb.2011.05.025 (2011).
85. Picking, J. W., Behrman, E. J., Zhang, L. & Krzycki, J. A. MtpB, a member of the MttB superfamily from the human intestinal acetogen *Eubacterium limosum*, catalyzes proline

- betaine demethylation. *J. Biol. Chem.* **294**, 13697–13707; 10.1074/jbc.RA119.009886 (2019).
86. Jeoung, J.-H. *et al.* The extended reductive acetyl-CoA pathway: ATPases in metal cluster maturation and reductive activation. *Biol. Chem.* **395**, 545–558; 10.1515/hsz-2013-0290 (2014).
 87. Richter, N., Zepeck, F. & Kroutil, W. Cobalamin-dependent enzymatic O-, N-, and S-demethylation. *Trends. Biotechnol.* **33**, 371–373; 10.1016/j.tibtech.2015.03.011 (2015).
 88. Kountz, D. J., Behrman, E. J., Zhang, L. & Krzycki, J. A. MtcB, a member of the MttB superfamily from the human gut acetogen *Eubacterium limosum*, is a cobalamin-dependent carnitine demethylase. *J. Biol. Chem.* **295**, 11971–11981; 10.1074/jbc.RA120.012934 (2020).
 89. Schilhabel, A. *et al.* The ether-cleaving methyltransferase system of the strict anaerobe *Acetobacterium dehalogenans*: analysis and expression of the encoding genes. *J. Bacteriol.* **191**, 588–599; 10.1128/JB.01104-08 (2009).
 90. Daas, P. J. *et al.* Purification and properties of an enzyme involved in the ATP-dependent activation of the methanol:2-mercaptoethanesulfonic acid methyltransferase reaction in *Methanosarcina barkeri*. *J. Biol. Chem.* **271**, 22339–22345; 10.1074/jbc.271.37.22339 (1996).
 91. Daas, P. J., Hagen, W. R., Keltjens, J. T., van der Drift, C. & Vogels, G. D. Activation mechanism of methanol:5-hydroxybenzimidazolylcobamide methyltransferase from *Methanosarcina barkeri*. *J. Biol. Chem.* **271**, 22346–22351; 10.1074/jbc.271.37.22346 (1996).
 92. Kräutler, B. Vitamin B12: chemistry and biochemistry. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 806–810; 10.1042/BST0330806 (2005).
 93. Lexa, D. & Saveant, J. M. The electrochemistry of vitamin B12. *Acc. Chem. Res.* **16**, 235–243; 10.1021/ar00091a001 (1983).
 94. Sperfeld, M., Diekert, G. & Studenik, S. Kinetic regulation of a corrinoid-reducing metallo-ATPase by its substrates. *Mol. Microbiol.* **92**, 598–608; 10.1111/mmi.12582 (2014).
 95. Nguyen, H. D., Studenik, S. & Diekert, G. Corrinoid activation by a RACE protein: studies on the interaction of the proteins involved. *FEMS Microbiol. Lett.* **345**, 31–38; 10.1111/1574-6968.12178 (2013).
 96. Svetlichny, V. A. *et al.* *Carboxydotherrmus hydrogenoformans* gen. nov., sp. nov., a CO-utilizing Thermophilic Anaerobic Bacterium from Hydrothermal Environments of Kunashir Island. *Syst. Appl. Microbiol.* **14**, 254–260; 10.1016/S0723-2020(11)80377-2 (1991).
 97. Zhuang, W.-Q. *et al.* Incomplete Wood-Ljungdahl pathway facilitates one-carbon metabolism in organohalide-respiring *Dehalococcoides mccartyi*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 6419–6424; 10.1073/pnas.1321542111 (2014).
 98. Poehlein, A. *et al.* An ancient pathway combining carbon dioxide fixation with the generation and utilization of a sodium ion gradient for ATP synthesis. *PloS one* **7**, e33439; 10.1371/journal.pone.0033439 (2012).
 99. Schiel-Bengelsdorf, B. & Dürre, P. Pathway engineering and synthetic biology using acetogens. *FEBS Lett.* **586**, 2191–2198; 10.1016/j.febslet.2012.04.043 (2012).
 100. Hennig, S. E. *et al.* ATP-induced electron transfer by redox-selective partner recognition. *Nat. Commun.* **5**, 4626; 10.1038/ncomms5626 (2014).
 101. Svetlitchnaia, T., Svetlitchnyi, V., Meyer, O. & Dobbek, H. Structural insights into methyltransfer reactions of a corrinoid iron-sulfur protein involved in acetyl-CoA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 14331–14336; 10.1073/pnas.0601420103 (2006).
 102. Banerjee, R. & Ragsdale, S. W. The many faces of vitamin B12: catalysis by cobalamin-dependent enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 209–247; 10.1146/annurev.biochem.72.121801.161828 (2003).

103. Meister, W. *et al.* Complex formation with the activator RACo affects the corrinoid structure of CoFeSP. *Biochemistry* **51**, 7040–7042; 10.1021/bi300795n (2012).
104. Mayer, E., Gardiner, D. J. & Hester, R. E. Resonance Raman spectra of vitamin B12 and some cobalt corrinoid derivatives. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2* **69**, 1350; 10.1039/F29736901350 (1973).
105. Goetzl, S. *et al.* Protein Dynamics in the Reductive Activation of a B12-Containing Enzyme. *Biochemistry* **56**, 5496–5502; 10.1021/acs.biochem.7b00477 (2017).
106. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685; 10.1038/227680a0 (1970).
107. Gill, S. C. & Hippel, P. H. von. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**, 319–326; 10.1016/0003-2697(89)90602-7 (1989).
108. Wilkins, M. R. *et al.* Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods. Mol. Biol.* **112**, 531–552; 10.1385/1-59259-584-7:531 (1999).
109. Buchanan, B. B., Lovenberg, W. & Rabinowitz, J. C. A comparison of clostridial ferredoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **49**, 345–353; 10.1073/pnas.49.3.345 (1963).
110. Menon, S. & Ragsdale, S. W. Role of the 4Fe-4S cluster in reductive activation of the cobalt center of the corrinoid iron-sulfur protein from *Clostridium thermoaceticum* during acetate biosynthesis. *Biochemistry* **37**, 5689–5698; 10.1021/bi9727996 (1998).
111. Lanzetta, P. A., Alvarez, L. J., Reinach, P. S. & Candia, O. A. An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal. Biochem.* **100**, 95–97; 10.1016/0003-2697(79)90115-5 (1979).
112. Kunzelmann, S. & Webb, M. R. A biosensor for fluorescent determination of ADP with high time resolution. *J. Biol. Chem.* **284**, 33130–33138; 10.1074/jbc.M109.047118 (2009).
113. Brune, M., Hunter, J. L., Corrie, J. E. & Webb, M. R. Direct, real-time measurement of rapid inorganic phosphate release using a novel fluorescent probe and its application to actomyosin subfragment 1 ATPase. *Biochemistry* **33**, 8262–8271; 10.1021/bi00193a013 (1994).
114. Maduro, M. E. coli Codon Usage Analyzer 2.1. Available at <https://faculty.ucr.edu/~mmaduro/codonusage/usage.htm> (2003).
115. Schrapers, P. *et al.* Axial Ligation and Redox Changes at the Cobalt Ion in Cobalamin Bound to Corrinoid Iron-Sulfur Protein (CoFeSP) or in Solution Characterized by XAS and DFT. *PloS one* **11**, e0158681; 10.1371/journal.pone.0158681 (2016).
116. Leartsakulpanich, U., Antonkine, M. L. & Ferry, J. G. Site-specific mutational analysis of a novel cysteine motif proposed to ligate the 4Fe-4S cluster in the iron-sulfur flavoprotein of the thermophilic methanococcus *Methanosarcina thermophila*. *J. Bacteriol.* **182**, 5309–5316; 10.1128/jb.182.19.5309-5316.2000 (2000).
117. Nakamura, M., Saeki, K. & Takahashi, Y. Hyperproduction of recombinant ferredoxins in *Escherichia coli* by coexpression of the ORF1-ORF2-iscS-iscU-iscA-hscB-hs cA-fdx-ORF3 gene cluster. *J. Biochem.* **126**, 10–18; 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022409 (1999).
118. Thieringer, H. A., Jones, P. G. & Inouye, M. Cold shock and adaptation. *Bioessays* **20**, 49–57; 10.1002/(SICI)1521-1878(199801)20:1<49::AID-BIES8>3.0.CO;2-N (1998).
119. Jiang, W., Hou, Y. & Inouye, M. CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone. *J. Biol. Chem.* **272**, 196–202; 10.1074/jbc.272.1.196 (1997).
120. Marques, H. M., Marsh, J. H., Mellor, J. R. & Munro, O. Q. The coordination of imidazole and its derivatives by aquocobalamin. *Inorg. Chim. Acta* **170**, 259–269; 10.1016/S0020-1693(00)80484-3 (1990).
121. Solscheid, C. *et al.* Development of a reagentless biosensor for inorganic phosphate, applicable over a wide concentration range. *Biochemistry* **54**, 5054–5062; 10.1021/acs.biochem.5b00449 (2015).

122. Rudolph, R., Westhof, E. & Jaenicke, R. Kinetic analysis of the reactivation of rabbit muscle aldolase after denaturation with guanidine-HCl. *FEBS Lett.* **73**, 204–206; 10.1016/0014-5793(77)80981-2 (1977).
123. Lemerrier, G., Bakalara, N. & Santarelli, X. On-column refolding of an insoluble histidine tag recombinant exopolyphosphatase from *Trypanosoma brucei* overexpressed in *Escherichia coli*. *J. Chromatogr. B* **786**, 305–309; 10.1016/s1570-0232(02)00745-6 (2003).
124. Liptak, M. D. & Brunold, T. C. Spectroscopic and computational studies of Co1+cobalamin: spectral and electronic properties of the "superreduced" B12 cofactor. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 9144–9156; 10.1021/ja061433q (2006).
125. Ravasco, J. M. J. M., Faustino, H., Trindade, A. & Gois, P. M. P. Bioconjugation with maleimides: A useful tool for chemical biology. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **25**, 43–59; 10.1002/chem.201803174 (2019).
126. Cleland, W. W. Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups. *Biochemistry* **3**, 480–482; 10.1021/bi00892a002 (1964).
127. Ramasamy, S., Kundu, T. K., Antholine, W., Manoharan, P. T. & Rifkind, J. M. Internal spin trapping of thiyl radical during the complexation and reduction of cobalamin with glutathione and dithiothreitol. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **16**, 25–38; 10.1142/S1088424611004051 (2012).
128. Mayhew, S. G. The redox potential of dithionite and SO²⁻ from equilibrium reactions with flavodoxins, methyl viologen and hydrogen plus hydrogenase. *Eur. J. Biochem.* **85**, 535–547; 10.1111/j.1432-1033.1978.tb12269.x (1978).
129. Millis, K. K., Weaver, K. H. & Rabenstein, D. L. Oxidation/reduction potential of glutathione. *J. Org. Chem.* **58**, 4144–4146; 10.1021/jo00067a060 (1993).
130. Lukesh, J. C., Palte, M. J. & Raines, R. T. A potent, versatile disulfide-reducing agent from aspartic acid. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 4057–4059; 10.1021/ja211931f (2012).
131. Polakof, S., Míguez, J. M. & Soengas, J. L. A hepatic protein modulates glucokinase activity in fish and avian liver: a comparative study. *J. Comp. Physiol B, Biochem. Syst. Environ. Physiol.* **179**, 643–652; 10.1007/s00360-009-0346-4 (2009).
132. O'Brien, M. C. & McKay, D. B. How potassium affects the activity of the molecular chaperone Hsc70. I. Potassium is required for optimal ATPase activity. *J. Biol. Chem.* **270**, 2247–2250; 10.1074/jbc.270.5.2247 (1995).
133. Storer, A. C. & Cornish-Bowden, A. Concentration of MgATP²⁻ and other ions in solution. Calculation of the true concentrations of species present in mixtures of associating ions. *Biochem. J.* **159**, 1–5; 10.1042/bj1590001 (1976).
134. Molla, G. S., Himmelsbach, A., Wohlgemuth, R., Haupt, E. T.K. & Liese, A. Mechanistic and kinetics elucidation of Mg²⁺/ATP molar ratio effect on glycerol kinase. *Mol. Catal.* **445**, 36–42; 10.1016/j.mcat.2017.11.006 (2018).
135. Pettigrew, D. W., Yu, G. J. & Liu, Y. Nucleotide regulation of *Escherichia coli* glycerol kinase: initial-velocity and substrate binding studies. *Biochemistry* **29**, 8620–8627; 10.1021/bi00489a018 (1990).
136. Zhang, F. *et al.* Protein interactions studied by SAXS: effect of ionic strength and protein concentration for BSA in aqueous solutions. *J. Phys. Chem. B.* **111**, 251–259; 10.1021/jp0649955 (2007).
137. Volkov, A. N. Structure and function of transient encounters of redox proteins. *Acc. Chem. Res.* **48**, 3036–3043; 10.1021/acs.accounts.5b00343 (2015).
138. Parkin, A., Seravalli, J., Vincent, K. A., Ragsdale, S. W. & Armstrong, F. A. Rapid and efficient electrocatalytic CO₂/CO interconversions by *Carboxydotherrmus hydrogenoformans* CO dehydrogenase I on an electrode. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 10328–10329; 10.1021/ja073643o (2007).

139. Carrier, M.-F. Measurement of Pi dissociation from actin filaments following ATP hydrolysis using a linked enzyme assay. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **143**, 1069–1075; 10.1016/0006-291x(87)90361-5 (1987).
140. Kovács, M., Wang, F. & Sellers, J. R. Mechanism of action of myosin X, a membrane-associated molecular motor. *J. Biol. Chem.* **280**, 15071–15083; 10.1074/jbc.M500616200 (2005).
141. Duval, S. *et al.* Electron transfer precedes ATP hydrolysis during nitrogenase catalysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 16414–16419; 10.1073/pnas.1311218110 (2013).
142. Tal, M., Silberstein, A. & Nusser, E. Why does Coomassie Brilliant Blue R interact differently with different proteins? A partial answer. *J. Biol. Chem.* **260**, 9976–9980 (1985).
143. Wu, M. *et al.* Life in hot carbon monoxide: the complete genome sequence of *Carboxydotherrmus hydrogenoformans* Z-2901. *PLoS. Genet.* **1**, e65; 10.1371/journal.pgen.0010065 (2005).
144. Ledesma-García, L., Sánchez-Azqueta, A., Medina, M., Reyes-Ramírez, F. & Santero, E. Redox proteins of hydroxylating bacterial dioxygenases establish a regulatory cascade that prevents gratuitous induction of tetralin biodegradation genes. *Sci. Rep.* **6**, 23848; 10.1038/srep23848 (2016).
145. Fujiwara, I., Vavylonis, D. & Pollard, T. D. Polymerization kinetics of ADP- and ADP-Pi-actin determined by fluorescence microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 8827–8832; 10.1073/pnas.0702510104 (2007).
146. Schmid, D., Baici, A., Gehring, H. & Christen, P. Kinetics of molecular chaperone action. *Science (New York, N.Y.)* **263**, 971–973; 10.1126/science.8310296 (1994).
147. Selden, L. A., Kinosian, H. J., Estes, J. E. & Gershman, L. C. Impact of profilin on actin-bound nucleotide exchange and actin polymerization dynamics. *Biochemistry* **38**, 2769–2778; 10.1021/bi981543c (1999).
148. Seefeldt, L. C. *et al.* Control of electron transfer in nitrogenase. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **47**, 54–59; 10.1016/j.cbpa.2018.08.011 (2018).
149. Wilbanks, S. M. & McKay, D. B. How potassium affects the activity of the molecular chaperone Hsc70. II. Potassium binds specifically in the ATPase active site. *J. Biol. Chem.* **270**, 2251–2257; 10.1074/jbc.270.5.2251 (1995).
150. Nightingale, E. R. Phenomenological theory of ion solvation. Effective radii of hydrated ions. *J. Phys. Chem.* **63**, 1381–1387; 10.1021/j150579a011 (1959).
151. Strickland, S., Palmer, G. & Massey, V. Determination of dissociation constants and specific rate constants of enzyme-substrate (or protein-ligand) interactions from rapid reaction kinetic data. *J. Biol. Chem.* **250**, 4048–4052 (1975).
152. Johnson, K. A. A century of enzyme kinetic analysis, 1913 to 2013. *FEBS Lett.* **587**, 2753–2766; 10.1016/j.febslet.2013.07.012 (2013).
153. Shalaeva, D. N., Cherepanov, D. A., Galperin, M. Y., Golovin, A. V. & Mulkidjanian, A. Y. Evolution of cation binding in the active sites of P-loop nucleoside triphosphatases in relation to the basic catalytic mechanism. *eLife* **7**; 10.7554/eLife.37373 (2018).
154. Stefan, M. I. & Le Novère, N. Cooperative binding. *PLoS. Comput. Biol.* **9**, e1003106; 10.1371/journal.pcbi.1003106 (2013).
155. Pardee, J. D. & Spudich, J. A. Mechanism of K⁺-induced actin assembly. *J. Cell. Biol.* **93**, 648–654; 10.1083/jcb.93.3.648 (1982).
156. Morimatsu, M. *et al.* Spontaneous structural changes in actin regulate G-F transformation. *PloS one* **7**, e45864; 10.1371/journal.pone.0045864 (2012).
157. Chik, J. K., Lindberg, U. & Schutt, C. E. The structure of an open state of beta-actin at 2.65 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **263**, 607–623; 10.1006/jmbi.1996.0602 (1996).
158. Leferink, N. G. H. *et al.* Gating mechanisms for biological electron transfer: integrating structure with biophysics reveals the nature of redox control in cytochrome P450 reductase

- and copper-dependent nitrite reductase. *FEBS Lett.* **586**, 578–584; 10.1016/j.febslet.2011.07.003 (2012).
159. Marcus, R. A. On the theory of oxidation-reduction reactions involving electron transfer. I. *J. Chem. Phys.* **24**, 966–978; 10.1063/1.1742723 (1956).
 160. Holzwarth, A. R., Lenk, D. & Jahns, P. On the analysis of non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching curves: I. Theoretical considerations. *Biochim. Biophys. Acta.* **1827**, 786–792; 10.1016/j.bbabi.2013.02.011 (2013).
 161. Macdonald, J. L. & Pike, L. J. Heterogeneity in EGF-binding affinities arises from negative cooperativity in an aggregating system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 112–117; 10.1073/pnas.0707080105 (2008).
 162. Sohl, C. D. *et al.* Cooperativity in oxidation reactions catalyzed by cytochrome P450 1A2: highly cooperative pyrene hydroxylation and multiphasic kinetics of ligand binding. *J. Biol. Chem.* **283**, 7293–7308; 10.1074/jbc.M709783200 (2008).
 163. Ainslie, G. R., Shill, J. P. & Neet, K. E. Transients and cooperativity. A slow transition model for relating transients and cooperative kinetics of enzymes. *J. Biol. Chem.* **247**, 7088–7096 (1972).
 164. Buss, K. A. *et al.* Urkinase: structure of acetate kinase, a member of the ASKHA superfamily of phosphotransferases. *J. Bacteriol.* **183**, 680–686; 10.1128/JB.183.2.680-686.2001 (2001).
 165. Kruse, T. *et al.* Actin homolog MreB and RNA polymerase interact and are both required for chromosome segregation in *Escherichia coli*. *Genes. Dev.* **20**, 113–124; 10.1101/gad.366606 (2006).
 166. Esue, O., Cordero, M., Wirtz, D. & Tseng, Y. The assembly of MreB, a prokaryotic homolog of actin. *J. Biol. Chem.* **280**, 2628–2635; 10.1074/jbc.M410298200 (2005).
 167. Koga, Y. *et al.* Thermostable glycerol kinase from a hyperthermophilic archaeon: gene cloning and characterization of the recombinant enzyme. *Protein. Eng.* **11**, 1219–1227; 10.1093/protein/11.12.1219 (1998).
 168. Dürichen, H., Diekert, G. & Studenik, S. Redox potential changes during ATP-dependent corrinoid reduction determined by redox titrations with europium(II)-DTPA. *Protein. Sci.* **28**, 1902–1908; 10.1002/pro.3699 (2019).
 169. Kumar, M. & Kozlowski, P. M. Corrin ring-induced redox tuning. *Chemical communications (Cambridge, England)* **48**, 4456–4458; 10.1039/c2cc30529a (2012).
 170. Taguchi, A. T. *et al.* Unpaired Electron Spin Density Distribution across Reduced 2Fe-2S Cluster Ligands by ¹³Cβ-Cysteine Labeling. *Inorg. Chem.* **57**, 741–746; 10.1021/acs.inorgchem.7b02676 (2018).
 171. Birrell, J. A., Laurich, C., Reijerse, E. J., Ogata, H. & Lubitz, W. Importance of hydrogen bonding in fine tuning the 2Fe-2S cluster redox potential of HydC from *Thermotoga maritima*. *Biochemistry* **55**, 4344–4355; 10.1021/acs.biochem.6b00341 (2016).
 172. Kumar, M. & Kozlowski, P. M. A biologically relevant Co¹⁺...H bond: possible implications in the protein-induced redox tuning of Co²⁺/Co¹⁺ reduction. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **50**, 8702–8705; 10.1002/anie.201100469 (2011).
 173. Cohn, M. & Hughes, T. R. Nuclear magnetic resonance spectra of adenosine di- and triphosphate. II. Effect of complexing with divalent metal ions. *J. Biol. Chem.* **237**, 176–181 (1962).
 174. Kityk, R., Kopp, J., Sinning, I. & Mayer, M. P. Structure and dynamics of the ATP-bound open conformation of Hsp70 chaperones. *Mol. Cell.* **48**, 863–874; 10.1016/j.molcel.2012.09.023; (2012).
 175. Wisniewska, M. *et al.* Crystal structures of the ATPase domains of four human Hsp70 isoforms: HSPA1L/Hsp70-hom, HSPA2/Hsp70-2, HSPA6/Hsp70B', and HSPA5/BiP/GRP78. *PLoS one* **5**, e8625; 10.1371/journal.pone.0008625 (2010).

176. Russell, R., Jordan, R. & McMacken, R. Kinetic characterization of the ATPase cycle of the DnaK molecular chaperone. *Biochemistry* **37**, 596–607; 10.1021/bi972025p (1998).
177. Powers, M. V. *et al.* Targeting HSP70: the second potentially druggable heat shock protein and molecular chaperone? *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* **9**, 1542–1550; 10.4161/cc.9.8.11204 (2010).
178. Cooke, R. & Murdoch, L. Interaction of actin with analogs of adenosine triphosphate. *Biochemistry* **12**, 3927–3932; 10.1021/bi00744a022 (1973).
179. Chemaly, S. M., Hasty, R. A. & Pratt, J. M. The chemistry of vitamin B12. Part 23. Decomposition of the cobalt(I) cobalamin B12s in aqueous solution; a novel oscillating reaction. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2223; 10.1039/DT9830002223 (1983).
180. Dereven'kov, I. A., Salnikov, D. S., Silaghi-Dumitrescu, R., Makarov, S. V. & Koifman, O. I. Redox chemistry of cobalamin and its derivatives. *Coord. Chem. Rev.* **309**, 68–83; 10.1016/j.ccr.2015.11.001 (2016).
181. Lambeth, D. O. & Palmer, G. The kinetics and mechanism of reduction of electron transfer proteins and other compounds of biological interest by dithionite. *J. Biol. Chem.* **248**, 6095–6103 (1973).
182. Tsukahara, K. & Wilkins, R. G. Kinetics of reduction of eight viologens by dithionite ion. *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 2632–2635; 10.1021/ja00295a013 (1985).
183. Weigmann, H.-D. Reduction of disulfide bonds in keratin with 1,4-dithiothreitol. I. Kinetic investigation. *J. Polym. Sci. A-1 Polym. Chem.* **6**, 2237–2253; 10.1002/pol.1968.150060819 (1968).
184. Peters, J. W. *et al.* A new era for electron bifurcation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **47**, 32–38; 10.1016/j.cbpa.2018.07.026 (2018).
185. Palleros, D. R., Shi, L., Reid, K. L. & Fink, A. L. hsp70-protein complexes. Complex stability and conformation of bound substrate protein. *J. Biol. Chem.* **269**, 13107–13114 (1994).
186. Walter, U. Inhibition of molybdenum blue formation by ATP. *Experientia* **37**, 1263–1265; 10.1007/BF01948349 (1981).
187. Guo, M. & Chen, Y. Coenzyme cobalamin: biosynthesis, overproduction and its application in dehalogenation—a review. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **17**, 259–284; 10.1007/s11157-018-9461-6 (2018).

7 Anhang

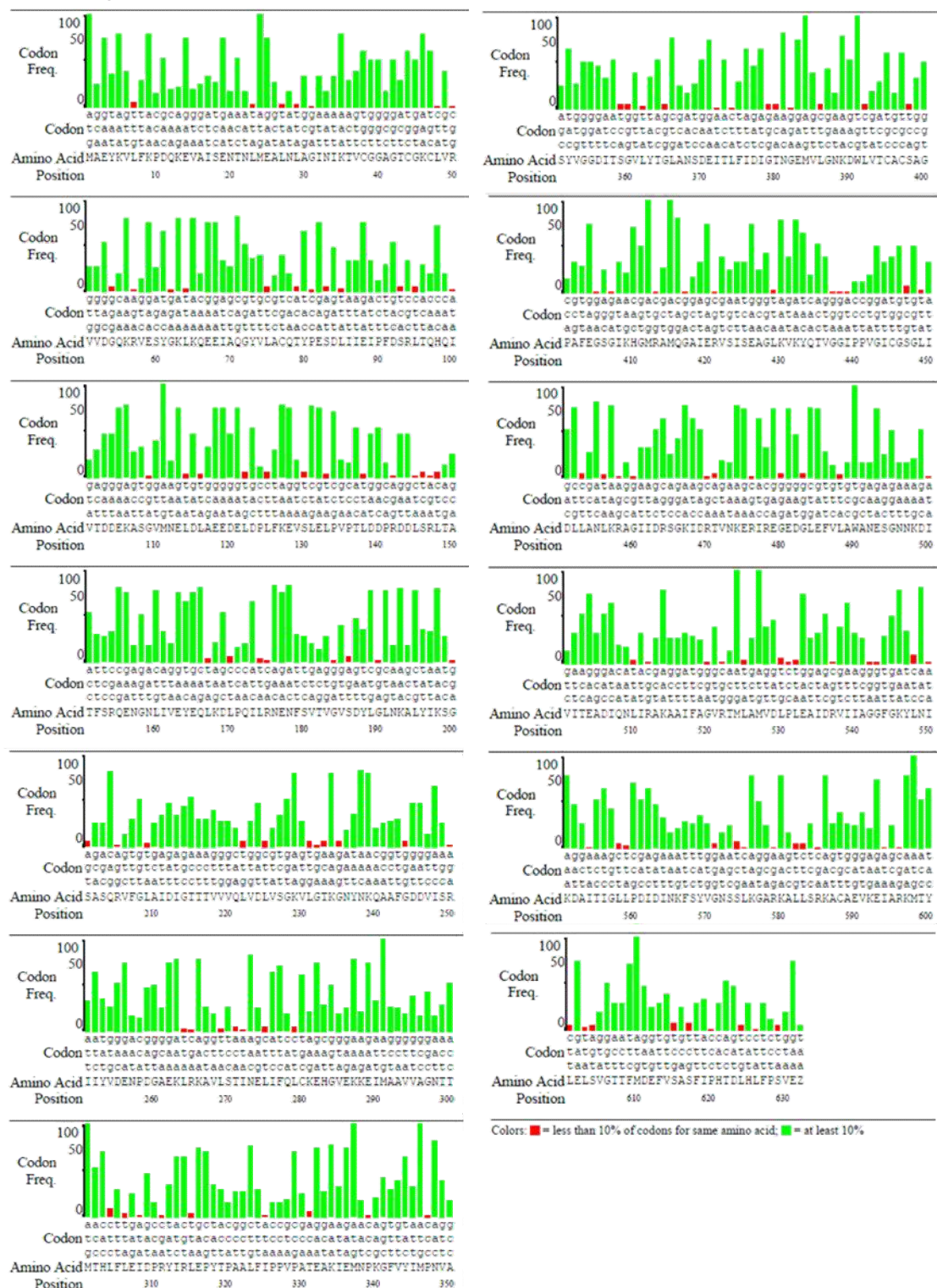


Abbildung 7-1. Gensequenzanalyse mittels *E. coli*-Codon-Usage-Analyzer 2.1™ am Beispiel des für RACo codierendes Gens *orf7*. Gezeigt sind die Aminosäuren (Amino Acid), die Codons und die Codonverwendung in % (Codon Freq.). Codons mit einer kritischen Codonverwendung von unter 10 % sind in roten Balken und mit nicht-kritischer Codonverwendung von über 10 % sind in grünen Balken dargestellt.



Abbildung 7-2. Gensequenzanalyse mittels *E. coli*-Codon-Usage-Analyzer 2.1™ bei der Expression in Rosetta (DE3) am Beispiel des für RACo codierendes Gens *orf7*. Gezeigt sind die Aminosäuren (Amino Acid), die Codons und die Codonverwendung in %. Codons mit einer kritischen Codonverwendung von unter 10 % sind in roten Balken und mit nicht kritischer Codonverwendung von über 10 % sind in grünen Balken dargestellt. Die durch Rosetta (DE3) exprimierten tRNAs mit einer kritischen Codonverwendung von unter 10 % wurden durch Codons mit nicht-kritischer Codonverwendung von über 10 % ersetzt.

Tabelle 7-1. Codons der Gene *orf7*, *acsC* und *acsD* mit einer kritischen Codonverwendung von unter 10 % in *E.coli*.

Gen	Codons mit einer kritischen Codonverwendung von unter 10 % in <i>E.coli</i>	Codons mit einer kritischen Codonverwendung im <i>E. coli</i> -Stamm Rosetta (DE3)
<i>orf7</i> (codierend für RACo)	21 %	13 %
<i>acsC</i> (codierend für CfsA)	17 %	10 %
<i>acsD</i> (codierend für CfsB)	19 %	13 %

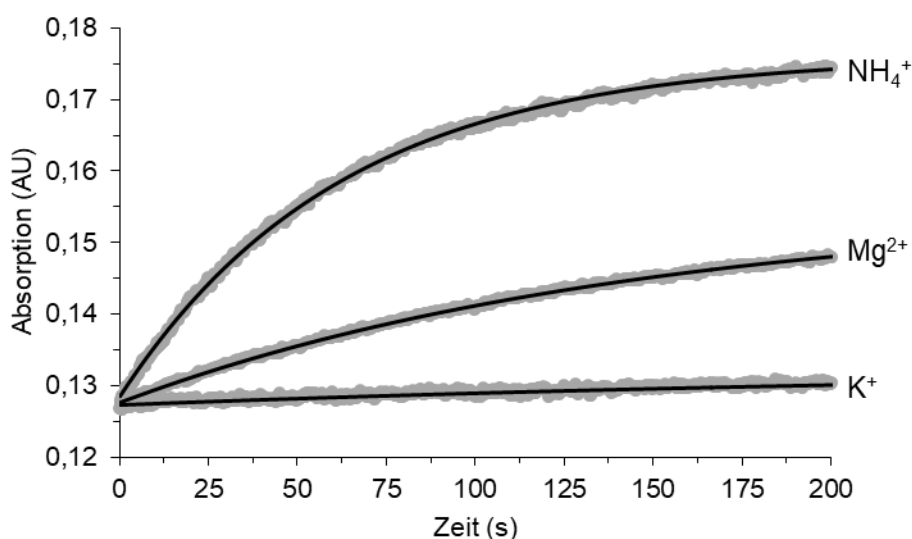


Abbildung 7-3. Änderung der Absorption über die Zeit durch den ATP-gekoppelten Elektronentransfer von RACo^{red}:Co(II)FeSP. Die Abbildung zeigt am Beispiel von 1 mM ATP und 3 mM von jeweils NH₄⁺, Mg²⁺ und K⁺ die mathematische Anpassung (schwarz) durch Gleichung 1 an die gemessene Absorptionsänderung (grau).

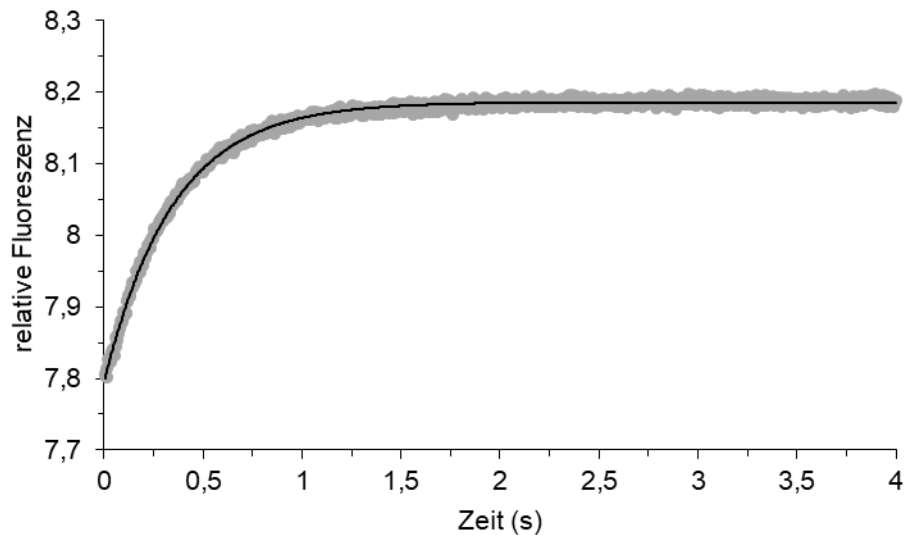


Abbildung 7-4. Änderung der relativen Fluoreszenz über die Zeit bei der Komplexbildung von RACo^{ox}:Co(II)FeSP. Die Abbildung zeigt am Beispiel von 0,5 μ M CoFeSP und 9 μ M RACo bei 150 mM NaCl die Fluoreszenzänderung bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm und einem Emissionsfilter mit dem *cut-off* 320 nm (grau) und die mathematische Anpassung (schwarz) durch Gleichung 1.

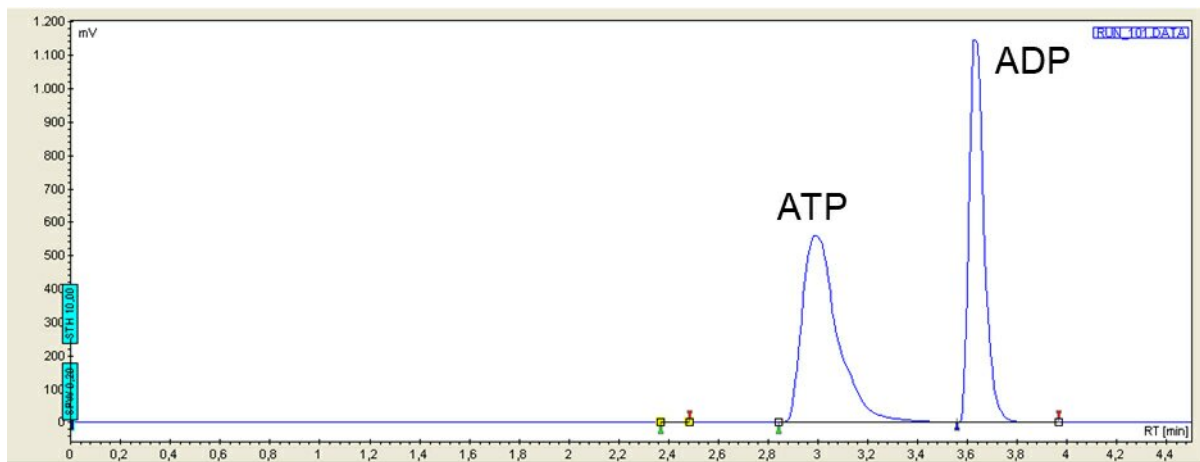


Abbildung 7-5. Chromatogramm der Trennung von ATP und ADP mittels HPLC.

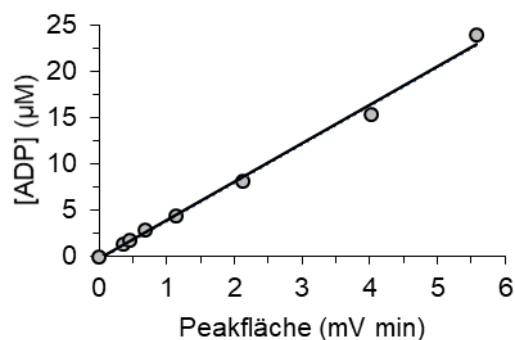


Abbildung 7-6. Kalibriergerade zur ADP-Quantifizierung mittels HPLC.

8 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACS	Acetyl-CoA-Synthase
ADP	Adenosindiphosphat
AE	<i>Activating Enzyme</i>
AMP-PCP	Adenosin-5'-[(β , γ)-methyleno]triphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulphate
ASKHA	<i>Acetate and Sugar Kinases / Heat Shock protein 70/Actin</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATPyS	Adenosin 5'-O-(3-thio)triphosphat
BCR	Benzoyl-CoA-Reduktase
CAPS	N-Cyclohexyl-3-aminopropansulfonsäure
Cfs	CoFeSP <i>subunit</i>
CoA	Coenzym A
CoFeSP	<i>Corrinoid Iron-Sulfur Protein</i>
CP	<i>Corrinoid Protein</i>
DCCP	<i>Double-Cubane Cluster Protein</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DT	Natriumdithionit
DTT	Dithiothreitol
G	Gleichung
His ₆ -tag	Hexahistidin-tag
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
Hsp70	<i>Heat Shock Protein 70</i>
IMAC	<i>Immobilised Metal Affinity Chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
MAP	<i>Methyltransferase Activation Protein</i>
MDCC	N-[2-(l-maleimidyl)ethyl]-7-(diethylamino)coumarin-3-carboxamid
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MT	Methyltransferase
OD ₆₀₀	Dichte bei 600 nm
Orf	<i>Open Reading Frame</i>
PAGE	<i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
PBP	Phosphat-Bindungsprotein

PDB	<i>Protein Data Bank</i>
P _i	Orthophosphat
RACE	<i>Reductive Activase of Corrinoid Enzymes</i>
RACo	<i>Reductive Activator of CoFeSP</i>
rpm	<i>Rotation per Minute</i>
RS	Reaktionsschema
SDS	Natriumdodecylsulfat
TECP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEMED	N,N,N',N'-Tetra-methylethylenediamin
TEV	<i>Tobacco-Etch-Virus</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
v/v	Volumenprozent
w/v	Massenprozent

9 Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Holger Dobbek für die Bereitstellung dieses sehr interessanten Themas und das mir entgegengebrachte Vertrauen bedanken. Außerdem bedanke ich mich sehr für die zahlreichen Ratschläge und Gespräche, die oft mit dem Satz „Hallo Holger, ich habe mal eine kurze Frage.“ begannen und in einem einstündigen Gespräch mündeten.

Ich bedanke mich auch sehr bei Dr. Jae-Hun Jeoung für seine vielen theoretischen und praktischen Hilfen, besonders während meiner Anfangszeit in der Arbeitsgruppe. Vielen Dank für die Einführung in das anaerobe Arbeiten und die zahlreichen Laborgeräte, außerdem natürlich für die zahlreichen Ratschläge (z. B. Focus!) und die angenehme Arbeitsatmosphäre!

Bei Dr. Berta Martins möchte ich mich für die Unterstützung und Zusammenarbeit bei der Bearbeitung der AE:CP-Proteinstruktur bedanken und dafür, dass sie sich viel Zeit für mich bei der Einarbeitung und der Erstellung des Strukturmodells in Coot genommen hat.

Des Weiteren danke ich Prof. Dr. Peter Hildebrandt, Dr. Ingo Zebger, Charlotte Wiemann, Prof. Dr. Robert Bittl, Dr. Christian Teutloff und Marcel Gauglitz für die Kooperation und die spektroskopischen Untersuchungen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Julian Kreibich für die gute Zusammenarbeit bei der Klonierung und den ersten Versuchen der CoFeSP-Reinigung. Außerdem für über 4 Jahre Banknachbarschaft, einer angenehmen Arbeitsatmosphäre und gute Laune abseits vom „Der-Kram-hat-schon-wieder-nicht-funktioniert-Laboralltag“.

Ein besonderer Dank gilt auch Gisa Baumert und Rainer Dietrich für ihre Unterstützung! Gisa für die Hilfe bei den Expressionen, Puffern und zahlreichen Experimenten. Vor allen Dingen auch für die Geduld mit meinen „Wir-machen-das-etwas-komplizierter-Protokollen“. Und Rainer für eigentlich alles! Für den Aufbau und die Reparatur von Laborgeräten, für die Wartung der Zelte und für den Bau von neuen Geräten. Wer nebenbei Mikrochips programmiert und HPLC-Anlagen repariert, stellt jawohl MacGyver locker in den Schatten.

Ich bedanke mich bei Louis Lauterbach und Alexander Lipka, die ich als Bachelor betreuen durfte und mir sehr gut bei der Etablierung verschiedener Methoden geholfen haben.

Vielen Dank an die HiWis Florian, Jakob, Anastasia und Maria für die Bereitstellung der Medien, Puffer, Antibiotika und SDS-Gele.

Ich danke Barbara Franke für alles Bürokratische, was ich teilweise nur noch unterschreiben musste, ihre sehr freundliche Art und die vielen „nicht-Labor-Gespräche“.

Danke an Julia Ilina und Martin Bommer durch die man abends/nachts oder am Wochenende nie alleine im Labor war und für die gegenseitige Versorgung mit Abendessen aus dem Lidl.

Ich möchte auch meinen Raumkollegen Martin Winkler und Jakob Ruickholdt für die zahlreichen Diskussionen und den Austausch von Gedanken zu den jeweiligen Projekten danken. MLU-RuleZ!

Außerdem bedanke ich mich bei allen Mitgliedern und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, welche ich kennenlernen durfte. Danke Sabine, Friederike, Stefan, Lilith, Christina, Tobias, Cora, Yudhajeet, Lior, Mohamed und Piotr. Ich bin immer gern ins Labor gekommen, nicht zuletzt wegen der freundlichen Arbeitsatmosphäre.

Ich möchte mich natürlich auch bei meiner Familie und ganz besonders bei meinen Eltern für die bedingungslose Unterstützung bedanken. Danke Mami und Papa! Ich bin voll und ganz euer Sohn!

Zu guter Letzt danke ich Julie für ihre liebenswürdige Art, für das Verständnis, wenn es mal wieder länger dauert, für ein bisschen mehr Ordnung in meinem Leben und die Unterstützung in so vielen Bereichen.

10 Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Die aus fremden Quellen übernommenen Gedanken wurden als solche kenntlich gemacht.

Berlin den 04.01.2021

Felix Neumann